

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELISA HIZURU UEMURA YAMANAKA

**INCIDÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
Escherichia coli E *Enterococcus* spp ISOLADOS COMO INDICADORES DE
CONTAMINAÇÃO FECAL EM ÁGUA DE CONSUMO DE FONTES
ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA**

CURITIBA

2011

ELISA HIZURU UEMURA YAMANAKA

**INCIDÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
Escherichia coli E *Enterococcus spp* ISOLADOS COMO INDICADORES DE
CONTAMINAÇÃO FECAL EM ÁGUA DE CONSUMO DE FONTES
ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, como parte das exigências para obtenção de título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Leise Bastos Monteiro

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Regina Beux

CURITIBA

2011

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Yemenaka, Elise Hizuru Uemura

Incidência, fatores de virulência e resistência a antibióticos de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp isolados como indicadores de contaminação fecal em águas de consumo de fontes alternativas de Curitiba e Região Metropolitana. / Elise Hizuru Uemura Yemenaka. – Curitiba, 2011.

148 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Cristina Leise Bastos Monteiro

Co-orientadora: Márcia Regina Beux

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Água – Poluição 2. Enterobacterias 3. I. Título II. Monteiro, Cristina Leise Bastos III. Beux, Márcia Regina IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.95



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**INCIDÊNCIA, FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS
DE ESCHERICHIA COLI E ENTEROCOCOS ISOLADOS COMO INDICADORES
DE CONTAMINAÇÃO FECAL EM ÁGUA DE CONSUMO DE FONTES
ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA”.**

por

ELISA HIZURU UEMURA YAMANAKA

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

Prof.ª. Dr.ª. Cristina Leise Bastos Monteiro (presidente)

Prof.ª. Dr.ª. Lauka Lúcia Cogo

Prof.ª. Dr.ª. Wanda Moscalewski Abrahão

**Prof.ª. Dr.ª. Márcia Regina Beux
Membro Suplente**

Curitiba, 16 de junho de 2011.

**Dedico este trabalho
Aos pais, Hideomi e Mieko,
Ao Akira, esposo,
Aos filhos, Diogo e Gabriel,
Pelo amor, compreensão e apoio,
Por quem sou e pelo que conquistei.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por proporcionar a vida, energia e saúde e, uma natureza tão imensa e encantadora, com muito para se pesquisar sobre ela.

A todas as pessoas e entidades que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho. Nomear todos é uma tarefa quase impossível, além de correr o risco de uma omissão absolutamente injusta e imperdoável. A ordenação a seguir também foi uma tarefa árdua, pois todos foram de suma importância.

Aos pais, exemplos de pessoas, que fazem o bem sem olhar a quem, que não mediram esforços para educar seus sete filhos e, na sua simplicidade e sabedoria oriental nos ensinaram que o maior bem material que eles poderiam deixar é a nossa educação.

Ao Akira meu querido esposo, e filhos Diogo e Gabriel, preciosidades da minha vida, pela compreensão, apoio, incentivo em minhas decisões profissionais e pelos sacrifícios para mais esta conquista. Obrigada Gabriel por pedir silêncio aos primos enquanto eu estudava.

Aos diretores da Laborclin, Prof. Dr. Carlos Henrique Vianna, D. Ilsa e Carlos Eduardo, pelo incentivo, apoio financeiro e compreensão para mais esta conquista.

Às professoras Cristina Leise Bastos Monteiro e Márcia Regina Beux, pela orientação, oportunidade, amizade, apoio, confiança, carinho, paciência e por tudo que me ensinam.

Às irmãs, Adriana e Eunice, companheiras, guerreiras, que além da ajuda que dão, muitas vezes dão o ombro fraterno para os momentos de dificuldade. Aos irmãos e cunhados, pela compreensão e apoio em inúmeros momentos.

Aos sogros, Toshiyuki (in memorian) e Sayo, pelo carinho e inspiração à escolha do tema.

Às coordenadoras do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná pela oportunidade que me deram para retornar à bancada acadêmica.

Aos professores Líbera Costa, Laura Lúcia Cogo, Keite Nogueira, Cintia Pichet, Aguinaldo Nascimento e Alessandra Daur que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores, Wanda Abrahão, Carmen Kataoka, Sérgio Fracalanza e ao Homero Arruda pela amizade, apoio e incentivo. Aos professores das disciplinas, por terem dado suporte técnico e científico.

A todos os amigos da Laborclin pelo apoio e compreensão às minhas ausências ao trabalho, em especial às amigas do setor técnico, que além de muita força e incentivo, contribuíram muito para que este trabalho pudesse ser realizado.

A todos que colaboraram com a coleta das amostras de água, principalmente em lugares de difícil acesso.

Aos colegas da Câmara Técnica de Controle de Qualidade da AESBE, pelo incentivo e apoio à escolha do tema.

Ao Roberto da gráfica, pela amizade e apoio.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

Dalai Lama

RESUMO

Águas provenientes de fontes e poços comunitários são consideradas fontes alternativas de abastecimento, no entanto para serem consumidas por seres humanos devem apresentar-se livres de indicadores de contaminação fecal. Micro-organismos entéricos como coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* são empregados como indicadores de potabilidade. *Enterococcus* spp faz parte da flora intestinal normal e também considerado indicador de contaminação fecal, o qual apresenta como característica intrínseca a multirresistência a drogas antimicrobianas e constitui a segunda causa mais importante de infecções hospitalares. Para avaliar o risco de consumo desse tipo de água é necessário avaliar as amostras não só sob o aspecto vinculado aos parâmetros legais, mas principalmente aos vinculados à incidência de isolados resistentes a antibióticos e/ou com fatores de virulência nesses indicadores em virtude da presença de linhagens com potencial risco patogênico. Foram avaliadas 39 amostras de água de fontes alternativas, utilizadas pela população de Curitiba e região metropolitana. A maioria dos isolados de *Enterococcus* spp foi *Enterococcus faecalis* (78,4%), seguido de *Enterococcus faecium* (13,5%). Ao avaliar a sensibilidade aos antibióticos, através do método de disco-difusão, todos os 37 isolados de *Enterococcus* spp foram sensíveis à vancomicina e ampicilina, no entanto somente 24% foram sensíveis a todos os antibióticos testados, sendo que 37,8% dos isolados apresentaram multirresistência. Os antibióticos que apresentaram menor índice de sensibilidade foram a eritromicina (21,6%), seguido de rifampicina (43,2%) e, dentre os antibióticos de alta resistência, 8,1% dos isolados foram resistentes à gentamicina e 10,8% à estreptomicina. Dentre os 23 isolados de *E. coli*, todos foram sensíveis à cefoxitina, gentamicina, ciprofloxacina, ampicilina e cefepime, no entanto somente 39,1% foram sensíveis a todos os antibióticos testados e 26,1% dos isolados apresentaram multirresistência. Os antibióticos que apresentaram menor índice de sensibilidade foram meropenem (69,6%), seguido de cefuroxima (78,3%). Dentre os fatores de virulência em *Enterococcus* spp, 40,5% apresentaram gelatinase, 43,2% caseinase, 32,4% hemolisina, 2,7% beta-lactamase e 35,1% gene *ace*. Não foram detectados fatores e genes de virulência diarreioogênicos nos isolados de *E. coli*. O potencial risco patogênico pelo consumo de águas provenientes de fontes alternativas em áreas urbanas revelou-se pelo fato de estarem sendo consumidas sem desinfecção prévia e onde somente 30,8% das amostras apresentaram-se livres de indicadores de contaminação fecal, e também pela presença de linhagens resistentes a antibióticos e/ou *Enterococcus* spp carreando fatores de virulência e/ou gene de virulência. Ao recuperar *Enterococcus* spp em 25,6% dos pontos onde *E. coli* não foi detectada, a inclusão deste indicador contaminação fecal torna-se necessária, potencializado pelo fato de que linhagens avirulentas podem tornar-se virulentas através da transferência de genes de resistência e/ou de virulência e pela seleção positiva de linhagens resistentes, principalmente pela habilidade de colonizar o trato gastrointestinal em paciente sob antibioticoterapia prolongada.

Palavras-chave: Indicador de contaminação fecal. Potencial risco patogênico. Resistência a antibióticos. Fatores de virulência.

ABSTRACT

Water from community wells and fountains are considered alternative water sources, however to be consumed by humans should be free of fecal indicators of contamination. Enteric micro-organisms such as coliforms thermotolerants and *Escherichia coli* are used as drinkability indicators. *Enterococcus* spp are part of the normal intestinal flora and also an indicator of fecal contamination, which have the intrinsic multidrug resistance to antimicrobial drugs and are the second most important cause of hospital infections. To assess the risk of consumption of this type of water is necessary to evaluate the samples not only from the aspect related to the legal parameters, but mostly linked to the incidence of isolates resistant to antibiotics and/or carrying virulence factors of these indicators due to the potential presence of pathogenic character strains. It was evaluated 39 samples of water from alternative sources, used by the population of Curitiba and metropolitan region. Most isolates of *Enterococcus* spp were *Enterococcus faecalis* (78.4%), followed by *Enterococcus faecium* (13.5%). Among 37 isolates of *Enterococcus* spp assessed the sensitiveness for antibiotics by the diffusion disk method, all of them were sensitive to vancomycin and ampicillin, but only 24% were sensitive to all tested antibiotics, where 37.8% isolates were multidrug resistant. The antibiotics that showed the lowest sensitivity were erythromycin (21.6%), followed by rifampicin (43.2%). Among the high resistance antibiotic, 8.1% isolates were resistant for gentamicin and 10.8% isolates for streptomycin. Among the 23 isolates of *E. coli*, all were susceptible to ceftiofur, gentamicin, ciprofloxacin, amikacin and cefepime, but only 39.1% were sensitive to all tested antibiotics and 26.1% isolates were multidrug resistant. The antibiotics that showed the lowest sensitivity were meropenem (69.6%), followed by cefuroxime (78.3%). Among the virulence factors on *Enterococcus* spp, 40.5% showed gelatinase, 43.2% caseinase, 32.4% hemolysin, 2.7% beta-lactamase and 35.1% gene *ace*. It wasn't detected diarrheagenic virulence factors neither genes on *E. coli* strains. Potential pathogenic risk by consuming water from alternative sources in metropolitan areas was revealed because they are being consumed without disinfection procedures and only 30.8% samples was without indicators of fecal contamination and they are carrying antibiotics resistant strains, *Enterococcus* spp harboring virulence factors and/or virulence gene. By recovering *Enterococcus* spp in 25.6% of the points where *E. coli* wasn't detected, the inclusion of this fecal contamination indicator becomes necessary, underlined by the fact that avirulent strains can become virulent through genetic transference of resistance genes and/or virulence and the positive selection of resistant mutants, mainly by the ability to colonize gastrointestinal tract on prolonged antimicrobial treatment.

Key words: Fecal contamination indicator. Potential pathogenic risk. Antibacterial resistance. Virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DE GENES DA VIRULÊNCIA DE <i>E. coli</i>	44
FIGURA 2 -	PANORAMA PARA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	50
FIGURA 3 -	MAPA DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA	57
FIGURA 4 -	LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA	58
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	64
FIGURA 6 -	MODELO DE TELAS PARA CÁLCULO DO CÓDIGO DE BACTRAY 1 E 2	72
FIGURA 7 -	MODELO DE RELATÓRIO DO RESULTADO DO BACTRAY ...	72
FIGURA 8 -	EXEMPLO DE TUBOS POSITIVOS PARA COLIFORMES TOTAIS ATRAVÉS DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO	86
FIGURA 9 -	EXEMPLOS DE CRESCIMENTO DOS <i>Enterococcus</i> spp EM MEMBRANA FILTRANTE	89
FIGURA 10 -	EXEMPLO DE CRESCIMENTO BACTERIANO NO MEIO CROMOGÊNICO CROMOCLIN US	96
FIGURA 11 -	EXEMPLO DE REAÇÕES BIOQUÍMICAS PELA <i>E. coli</i> NO SISTEMA BACTRAY 1 E 2	101
FIGURA 12 -	EXEMPLOS DE REAÇÃO DOS <i>Enterococcus</i> spp	102
FIGURA 13 -	EXEMPLOS DE PROVAS DE FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR <i>Enterococcus</i> spp NO SISTEMA BACTRAY 2	102
FIGURA 14 -	EXEMPLO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>Enterococcus</i> spp	105
FIGURA 15 -	ELETROFORESE DA PESQUISA DO GENE <i>ace</i>	108
FIGURA 16 -	EXEMPLO DE ANTIBIOGRAMA DE <i>E. coli</i> COM MULTIDISCO GRAM-NEGATIVO	109
FIGURA 17 -	EXEMPLO DE ANTIBIOGRAMA DE <i>Enterococcus</i> spp COM MULTIDISCO GRAM POSITIVO	112
FIGURA 18 -	EXEMPLOS DE FONTES ALTERNATIVAS AMOSTRADAS	115

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	COLIFORMES TOTAIS EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES E MÉTODOS	87
GRÁFICO 2 -	COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES	88
GRÁFICO 3 -	<i>E. coli</i> EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES	89
GRÁFICO 4 -	<i>Enterococcus</i> spp EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES E MÉTODOS	91
GRÁFICO 5 -	INDICADORES BACTERIANOS EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES	92
GRÁFICO 6 -	MICRO-ORGANISMOS TOTAIS POR TIPO DE FONTES	93
GRÁFICO 7 -	INCIDÊNCIA DE COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES, <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus</i> spp	95
GRÁFICO 8 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DOS MEIOS CONTENDO SUBSTRATOS CROMOGÊNICOS	96
GRÁFICO 9 -	DEMONSTRATIVO DE PONTOS COM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE INDICADORES BACTERIANOS	99
GRÁFICO 10 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS PONTOS LEGALMENTE POTÁVEIS	100
GRÁFICO 11 -	FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES DE <i>Enterococcus</i> spp	103
GRÁFICO 12 -	FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i>	110
GRÁFICO 13 -	FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA DOS ISOLADOS DE <i>Enterococcus</i> spp	113
GRÁFICO 14 -	CORRELAÇÃO DE POTABILIDADE Vs. POTENCIAL RISCO PATOGENICO	122

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - COMPARAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA CONHECIDOS EM ESPÉCIES DE <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i>	46
QUADRO 2 - MECANISMO DE RESISTÊNCIA DE <i>Enterococcus</i> spp	56
QUADRO 3 - MODELO PARA TABULAÇÃO DOS RESULTADOS PARA CÁLCULO DE ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	70
QUADRO 4 - MODELO DE FÓRMULA PARA CÁLCULO DE ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	70
QUADRO 5 - PROVAS PARA DIFERENCIAÇÃO DE <i>Enterococcus</i> spp ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS	74
QUADRO 6 - INICIADORES PARA PROVA DE PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX PARA GENES DE <i>E. coli</i> DIARREIOGÊNICAS	79
QUADRO 7 - SEQUENCIA DO INICIADOR UTILIZADO NA PESQUISA DO GENE DE VIRULENCIA DE <i>Enterococcus</i> spp – ADESINA DE COLÁGENO DE <i>E. faecalis</i>	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PADRÃO MICROBIOLÓGICO DE POTABILIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO	34
TABELA 2 -	NMP/mL PARA 10 PORÇÕES DE 10 mL	36
TABELA 3 -	NMP/mL PARA 5 PORÇÕES DE 20 mL	36
TABELA 4 -	NMP/mL PARA DIVERSAS COMBINAÇÕES DE TUBOS POSITIVOS EM 3 SÉRIES DE 5 TUBOS	37
TABELA 5 -	CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DAS AMOSTRAS	59
TABELA 6 -	RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES, <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp, E BACTÉRIAS COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE FONTES ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA	84
TABELA 7 -	QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES E MÉTODOS	87
TABELA 8 -	QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES	88
TABELA 9 -	QUANTIFICAÇÃO DE <i>E. coli</i> LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES	89
TABELA 10 -	QUANTIFICAÇÃO DE <i>Enterococcus</i> spp LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES E MÉTODOS	91
TABELA 11 -	QUANTIFICAÇÃO DE INDICADORES BACTERIANOS LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES	92
TABELA 12 -	ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MÉTODOS CROMOGÊNICOS PARA COLIFORMES TOTAIS E <i>Enterococcus</i> spp	98
TABELA 13 -	FREQUENCIA DE FATORES FENOTÍPICOS DE VIRULÊNCIA DE <i>Enterococcus</i> spp	106
TABELA 14 -	FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i>	109
TABELA 15 -	FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA DOS ISOLADOS DE <i>Enterococcus</i> spp	118
TABELA 16 -	FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA DOS ISOLADOS DE <i>E. faecalis</i>	113
TABELA 17 -	CORRELAÇÃO POTABILIDADE DA ÁGUA Vs. POTENCIAL RISCO PATOGÊNICO	117

TABELA 18 -	CORRELAÇÃO ENTRE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS FATORES DE VIRULÊNCIA E GENES DE VIRULÊNCIA ENTRE OS ISOLADOS DE <i>Enterococcus</i> spp	123
TABELA 19 -	INCIDÊNCIA DE ISOLADOS RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICO, FATORES DE VIRULÊNCIA E GENES DE VIRULÊNCIA	124

LISTA DE SIGLAS

AC	- Acurácia relativa
ace	- Gene da adesina ace
ACE	- Adesina do colágeno do <i>Enterococcus faecalis</i>
acm	- Gene da Adesina Acm
Agg	- Gene da substância de agregação
aggR	- Gene da substância de agregação
AGMEs	- Aminoglycoside-modifiers enzymes
AMC	- Amoxicilina/ácido clavulânico
AMI	- Amicacina
AMP	- Ampicilina
APHA	- American Public Health Association (Associação Americana de Saúde Pública)
ARA	- Arabinose
ATCC	- American Type Collection Culture
BCIG	- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide
β -D-GAL	- β -D-galactoside
β -D-GLIC	- β -D-glicoside
bfpA	- Gene que codifica adesina
BHI	- Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração)
CAZ	- Ceftazidima
CFL	- Cefalotina
CFX	- Cefoxitina
chuA	- Gene que codifica proteína de membrana externa de <i>E. coli</i> uropatogênica
CIP	- Ciprofloxacin
CLO	- Cloranfenicol
CLSI	- Clinical Laboratory Standards International
CPM	- Cefepime
CPRG	- Clorophenol-red- β -D-galactopyranoside
CRX	- Cefuroxima
CT	- Coliformes termotolerantes

CVD432	- Prova de DNA para <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>daaD</i>	- Gene da <i>E. coli</i> de aderência difusa
DEAEC	- <i>E. coli</i> de aderência difusa
DEC	- <i>E. coli</i> diarreiogênicas
DHFR	- Dihydrofolate reductase
DNA	- Deoxyribonucleic acid
Dp	- desvio padrão
<i>eaeA</i>	- Gene de <i>E. coli</i> enteropatogênica
EAEC	- <i>E. coli</i> enteroagregativa
EAggEC	- <i>E. coli</i> enteroagregativa produtora de verotoxina
VTEC	
EDTA	- Ácido etilenodiaminotracético
EHEC	- <i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica
EIEC	- <i>E. coli</i> enteroinvasora
EPA	- Environmental Protection Agency
EPEC	- <i>E. coli</i> enteropatogênica
Epm	- erro padrão da média
ERI	- Eritromicina
ESBL	- Extended spectrum beta-lactamase (beta lactamase de espectro extendido)
Esp	- Proteína de superfície extracelular do <i>Enterococcus</i> spp
<i>esp</i>	- Gene da proteína de superfície do <i>Enterococcus</i> spp
EST	- Estreptomicina
ESTAR	- Estreptomicina de alta resistência
ETEC	- <i>E. coli</i> enterotoxigênica
GEA	- gelatinase, substância de agregação e <i>esp</i>
<i>GeIE</i>	- Gene da gelatinase no <i>Enterococcus</i> spp
GEN	- Gentamicina
GENAR	- Gentamicina de alta resistência
I	- Sensibilidade intermediária
<i>ial</i>	- Gene da <i>E. coli</i> associado com invasão
IND	- Reação de indol
<i>ipaH</i>	- Gene da <i>E. coli</i> enteroinvasora
ITU	- Infecção do trato urinário
kb	- quilobase

KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenem enzyme
LDC	- Lisina descarboxilase
<i>lt</i>	- Gene da <i>E. coli</i> enterotoxigênica
LT	- Toxina termolábil da <i>E. coli</i> enterotoxigênica
MAN	- manitol
MENEC	- <i>E. coli</i> patogênica, causadora de meningites e septicemia
MER	- Meropenem
mg	- Miligrama
MHA	- Mueller Hinton agar
mL	- mililitros
MS	- Ministério da Saúde
MTS	- Meio de tolerância ao sal
MUG	- 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronide
MUGAL	- 4-metil-umbeliferil- β -D-galactopiranoside
NA	- Concordância negativa
ND	- Desvio negativo
NMP	- Número mais provável
ODC	- Ornitina descarboxilase
ODM	- Objetivos de Desenvolvimento do Milênio
OMS	- Organização Mundial da Saúde
ONPG	- ortonitrofenil- β -D-galactopiranoside
PA	- concordância positiva
PB	- Pares de base
PBP	- Proteína Ligadora de Penicilina
PCA	- Plate count agar
PCR	- Polimerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PD	- Desvio positivo
PEN	- Penicilina
p/v	- Peso / volume
PYR	- Teste da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide
QPS	- Presunção qualificada do status da segurança
R	- Resistente
RAF	- Rafinose
RHA	- Ramnose
RIF	- Rifampicina

RMC	- Região Metropolitana de Curitiba
RPM	- Rotações por minuto
S	- Sensível
RTEF	- Read-to-eat-food (alimento pronto para ser consumido)
SAC	- Sacarose
SCCmec	- <i>Staphylococcus</i> Cromossomic Cassete mec
SAL	- Salicina
SE	- Sensibilidade relativa
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
SOR	- Sorbitol
SP	- Especificidade relativa
<i>st</i>	- Genes da <i>E. coli</i> enterotoxigênica
<i>stla/stlb</i>	
<i>stx1/stx2</i>	- Genes da <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
ST	- Toxina termoestável da <i>E. coli</i> enterotoxigênica
SUT	- Sulfazotrim (cotrimoxazol)
TET	- Tetraciclina
TGE	- Tryptone glucose extract agar
TSA	- Tryptic Soy Agar
TSB	- Tryptic Soy Broth
TTC	- Triphenyl Tetrazolium Chloride = cloreto de trifetil tetrazólio
UFC	- Unidades formadoras de colônias
UPEC	- <i>E. coli</i> uropatogênica
USEPA	- United States Environmental Protection Agency
UV	- Ultravioleta
VAN	- Vancomicina
<i>vanA</i>	- Genes de resistência A para vancomicina
<i>vanB</i>	- Genes de resistência B para vancomicina
VRE	- <i>Enterococcus</i> spp resistentes à vancomicina
VREFS	- <i>Enterococcus faecalis</i> resistentes à vancomicina
VSEFS	- <i>Enterococcus faecalis</i> sensíveis à vancomicina
X-GAL	- 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranoside
X-GLU	- 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glucuronide
X-GLIC	- 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glicoside
μ g	- micrograma

μL - microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	26
1.1.1 Objetivo geral	26
1.1.2 Objetivos específicos	26
2 REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA	28
2.2 INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA	28
2.2.1 Coliformes totais	29
2.2.2 Coliformes termotolerantes	30
2.2.3 <i>E. coli</i>	31
2.2.4 <i>Enterococcus</i> spp	32
2.2.5 Atividade enzimática dos indicadores de contaminação	32
2.3 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ÁGUA POTÁVEL	33
2.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	34
2.4.1 Número mais provável (NMP)	35
2.4.2 Filtração em membrana	38
2.4.3 Presença / Ausência	39
2.5 DOENÇAS RELACIONADAS À ÁGUA	39
2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA	42
2.6.1 Patogenicidade da <i>E. coli</i>	42
2.6.1.1 <i>E. coli</i> diarreiogênicas	43
2.6.2 Patogenicidade de <i>Enterococcus</i> spp	44
2.6.3 Fatores de virulência de <i>Enterococcus</i> spp	45
2.6.3.1 Citolisina / hemolisina	46
2.6.3.2 Adesinas	47
2.6.3.3 Gelatinase	47
2.6.3.4 Outros fatores de virulência	48
2.7 RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA	49
2.7.1 Beta-lactamase (β-lactamase)	50

2.7.2 Resistência antibacteriana de <i>E. coli</i>	51
2.7.3 Resistência antibacteriana de <i>Enterococcus</i> spp	51
2.7.3.1 Resistência antibacteriana do <i>E. faecium</i>	52
2.7.3.2 <i>Enterococcus</i> spp vancomicina resistentes (VRE)	53
2.7.3.3 <i>Enterococcus</i> spp resistentes a aminoglicosídeos	55
2.7.3.4 Principais mecanismos de resistência de <i>Enterococcus</i> spp	56
3 MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 ÁREA DE ABRANGÊNCIA DO ESTUDO	57
3.2 COLETA, TRANSPORTE E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	58
3.3 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES, REAGENTES E INSUMOS	60
3.3.1 Coliformes totais, coliformes termotolerantes e <i>E. coli</i>	60
3.3.2 <i>Enterococcus</i> spp	61
3.3.3 Teste de disco-difusão	62
3.3.4 Outros	63
3.4 FLUXOGRAMA DE TRABALHO	64
3.5 PESQUISA DE CLORO LIVRE	64
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS PELO MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLOS E MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO	65
3.6.1 Método dos Tubos múltiplos	65
3.6.2 Método do Substrato Cromogênico	66
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES PELO MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLOS	66
3.8 QUANTIFICAÇÃO DE <i>E. coli</i> PELO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO	67
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE <i>Enterococcus</i> spp PELO MÉTODO DE MEMBRANA FILTRANTE EM MEIO DE CULTURA CLÁSSICO E CROMOGÊNICO	67
3.9.1 Método da membrana filtrante usando ágar m-enterococcus	68
3.9.2 Método da Membrana Filtrante usando substrato cromogênico	68
3.10 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOTOLERANTES COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO	69
3.11 DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E	

ESPECIFICIDADE ENTRE OS MÉTODOS EMPREGADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES E <i>Enterococcus</i> spp	69
3.12 AVALIAÇÃO DA POTABILIDADE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE FONTES ALTERNATIVAS	71
3.13 IDENTIFICAÇÃO DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus</i> spp ATRAVÉS DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS	71
3.13.1 Identificação bioquímica de <i>E. coli</i>	71
3.13.2 Identificação presuntiva de <i>Enterococcus</i> spp	73
3.13.3 Identificação bioquímica de <i>Enterococcus</i> spp	73
3.14 PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus</i> spp, ATRAVÉS DE MÉTODOS FENOTÍPICOS	74
3.14.1 Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de <i>E. coli</i>	74
3.14.2 Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de <i>Enterococcus</i> spp	75
3.14.2.1 Detecção da enzima β -lactamase em disco	75
3.14.2.2 Detecção da produção de gelatinase em ágar suplementado com gelatina	75
3.14.2.3 Detecção da produção de gelatinase com ágar leite desnatado	75
3.14.2.4 Detecção da produção de hemolisina	76
3.15 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus</i> spp, ATRAVÉS DE MÉTODOS GENOTÍPICOS	76
3.15.1 Preparo do DNA alvo	76
3.15.2 Preparo da mistura de reação para PCR	77
3.15.3. Análise dos produtos	77
3.15.4 Detecção dos genes de virulência dos isolados de <i>E. coli</i>	78
3.15.5 Detecção dos genes de virulência dos isolados de <i>Enterococcus</i> spp	79
3.16 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS APRESENTADOS PELOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus</i> spp ATRAVÉS DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO (KIRBY-BAUER)	80
3.16.1 Determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de <i>E. coli</i>	80
3.16.2 Determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados	80

de <i>Enterococcus spp</i>	
3.17 CORRELAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus spp</i> COM A POTABILIDADE DA ÁGUA E O RISCO POTENCIAL PATOGENICO DE CONSUMO POR SERES HUMANOS	81
3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1 PESQUISA DE CLORO LIVRE	82
4.2 DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus spp</i> NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE FONTES ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA	83
4.2.1 Quantificação de coliformes totais	86
4.2.2 Quantificação de coliformes termotolerantes	88
4.2.3 Quantificação de <i>E. coli</i>	89
4.2.4 Quantificação de <i>Enterococcus spp</i>	90
4.2.5 Quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes, <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus spp</i>	91
4.2.6 Incidência de bactérias termotolerantes com atividade enzimática nas amostras de água de fontes alternativas pelo método do substrato cromogênico	95
4.3 DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ENTRE OS MÉTODOS EMPREGADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES E <i>Enterococcus spp</i>	97
4.4 AVALIAÇÃO DA POTABILIDADE DA ÁGUA DE FONTES ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA	98
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus spp</i> ATRAVÉS DE .MÉTODOS BIOQUÍMICOS	101
4.5.1 Identificação de <i>E. coli</i>	101
4.5.2 Identificação de <i>Enterococcus spp</i>	101
4.6 PESQUISA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus spp</i> , ATRAVÉS DE MÉTODOS FENOTÍPICOS	104
4.6.1 Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de <i>E.</i> <i>coli</i>	104
4.6.2 Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de	105

<i>Enterococcus</i> spp	
4.7 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus</i> spp, ATRAVÉS DE MÉTODOS GENOTÍPICOS	107
4.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS APRESENTADOS PELOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> E <i>Enterococcus</i> spp ATRAVÉS DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO	108
4.8.1 Determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de <i>E. coli</i>	108
4.8.2 Determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de <i>Enterococcus</i> spp	111
4.9 CORRELAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i> spp COM A POTABILIDADE DA ÁGUA E O POTENCIAL RISCO PATOGÊNICO DE CONSUMO POR SERES HUMANOS	115
5 CONCLUSÕES	126
6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	128
REFERÊNCIAS	129
APÊNDICE	144

1 INTRODUÇÃO

Fonte alternativa de água é considerada como toda modalidade de abastecimento coletivo distinto do sistema de distribuição incluindo, entre outras, água de fonte e poço comunitário (BRASIL, 2004).

Cada comunidade ou país adota um padrão microbiológico para potabilidade da água. O padrão microbiológico adotado pela legislação brasileira para água de consumo humano, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras é a ausência de coliformes termotolerantes ou *Escherichia coli* em 100 mL de água (BRASIL, 2004). O regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural preconiza a ausência em 100 mL de água de coliformes totais, *E. coli*, *Enterococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens* (BRASIL, 2005).

Embora o mundo esteja à frente do cronograma para atingir o alvo dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio (ODM) 2015 para a água potável, em 2008 cerca de 13% da população mundial (884 milhões de pessoas) continuavam a confiar em fontes de água não tratada (água de superfície de lagos, rios, represas, poços escavados ou nascentes desprotegidas) para beber, cozinhar, tomar banho e outras atividades domésticas (WHO, 2010).

Em uma pesquisa realizada em 1.296 municípios, 51% das secretarias municipais de saúde dizem que os investimentos de sua cidade em vigilância da qualidade da água são insuficientes e não monitoram a qualidade da água. A falta de esgoto mata uma criança a cada 19 segundos no mundo (PNUD, 2009).

Segundo Cantusio Neto, Santos e Franco (2008), 47,8% dos municípios não possuem rede pública de coleta de esgoto. Cerca de 32% deles coletam e tratam o esgoto que recolhem das residências. Isto indica que cerca de 80% de todo o esgoto produzido no país é descartado in natura nos mananciais, fazendo da água uma importante fonte dispersora de patógenos.

Enterococcus spp fazem parte da flora intestinal normal e são considerados indicadores de contaminação fecal em água e alimentos (SILVA *et al.*, 2010). Até o final da década de setenta, com a identificação de cepas resistentes à vancomicina, estes foram considerados organismos relativamente inócuos. A habilidade do *Enterococcus* spp em colonizar o trato gastrointestinal de humanos por longos

períodos é um fator crucial que influencia no desenvolvimento de resistência às drogas. São intrinsecamente resistentes ou tolerantes a vários antibióticos e são rapidamente capazes de adquirir resistência a antibióticos, seja por mutação ou por aquisição de plasmídios ou transposons contendo sequências genéticas que conferem resistência a outras bactérias, estando entre os micro-organismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos no decorrer dos anos, tornando-se cada vez mais importantes agentes de doenças humanas devido à sua resistência a agentes antimicrobianos, aos quais outros estreptococos são geralmente sensíveis (ARIAS; CONTRERAS; MURRAY, 2010).

Enterococcus spp estão sendo identificados como agentes de infecções hospitalares, com crescente frequência, constituindo a segunda causa mais comum de infecções hospitalares do trato urinário e de feridas e a terceira causa mais comum de bacteremia hospitalar. É um potencial agente de sérias infecções, como é o caso de endocardites de próteses valvares, onde de 5 a 20% dos casos são decorrentes de infecção enterocócica. Como consequência, *Enterococcus* spp têm emergido como um dos principais desafios para os médicos, quando identificada como a causa de infecções graves ou fatais (TAVARES, 2000; MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000; FURUMURA *et al.*, 2006; WINN *et al.*, 2008; SHANKAR *et al.*, 1999). O primeiro caso de *Enterococcus* spp resistente à vancomicina (VRE) no Brasil foi ocasionado por *Enterococcus faecium*, em Curitiba, Paraná (DALLA COSTA *et al.*, 1998). A maioria de *E. faecium* isolados tem se apresentado resistentes aos três antibióticos anti-enterocócicos mais tradicionalmente úteis que são a ampicilina, vancomicina e aminoglicosídeos de alta resistência (ARIAS; CONTRERAS; MURRAY, 2010).

E. coli é a espécie bacteriana mais comumente isolada em laboratórios clínicos e tem sido incriminada em doenças infecciosas acometendo praticamente todos os tecidos e sistemas orgânicos dos seres humanos (WINN *et al.*, 2008).

Diarréia é a principal causa de doenças e mortes, principalmente em países em desenvolvimento, acometendo principalmente crianças, pacientes adênticos e visitantes do exterior. São conhecidos seis mecanismos distintos para causar enterite ou gastroenterite, sendo *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroativasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (WINN *et al.*, 2008; OKEKE, 2009).

A infecção humana por *E. coli* O157:H7 e outras *E. coli* produtoras de toxina tipo Shiga (STEC) têm sido registradas em mais de 30 países de seis continentes. O sorotipo virulento *E. coli* O157:H7 está associado a colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica (SHU). A maior incidência de SHU é na Argentina onde a enfermidade é endêmica. O Comitê de Nefrologia da Sociedade Argentina de Pediatria registra aproximadamente 250 casos novos por ano. Em 1998 a incidência foi de 8,2 por 100.000 em crianças menores de cinco anos, com frequência maior entre 6 a 24 meses. No Brasil, a primeira cepa de *E. coli* O157:H7 foi isolada e identificada em Parelheiros, no município de São Paulo, a partir de uma amostra de água de poço, em uma chácara, não tendo sido nunca identificada em material humano (SÃO PAULO, 2000).

Em recente surto de *E. coli* enterohemorrágica na Europa, a Alemanha havia notificado ao escritório regional da OMS (Organização Mundial da Saúde) na Europa, 520 casos de SHU e 1.213 casos de *E. coli* enterohemorrágica até o dia 02 de junho de 2011, com 17 óbitos somente na Alemanha e uma morte na Suécia causada pela cepa rara da bactéria *E. coli* O104:H4, ou mais precisamente *E. coli* enteroagregativa produtora de verotoxina (EAaggEC VTEC) O104:H4. A bactéria pode ser transmitida por contato pessoa a pessoa, bem como através de alimentos e água contaminada e contato direto com animais (BRASIL, 2011; WHO, 2011).

Resistência antimicrobiana é uma séria ameaça para o tratamento de doenças infecciosas e uma das principais preocupações para a saúde pública do século 21. Embora o uso de antibióticos tenha sido a maior causa para o desenvolvimento da resistência e seleção de micro-organismos resistentes, a ingestão de água contaminada com bactérias resistentes a antimicrobianos pode contribuir para a prevalência de resistência antimicrobiana em humanos. A resistência aos antimicrobianos é extremamente variável entre os países, as regiões e a origem das linhagens, hospitalar ou comunitária (TAVARES, 2000).

Para garantir a inocuidade da água proveniente de fontes alternativas torna-se adequado pesquisar os indicadores de contaminação fecal *E. coli* e *Enterococcus* spp, bem como fatores de virulência e perfil de resistência dos isolados, correlacionando com a potabilidade da água e o potencial risco patogênico de consumo por seres humanos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Determinar incidência, fatores de virulência e perfil de resistência a antibióticos de isolados de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp, estes obtidos por métodos de quantificação de indicadores de contaminação fecal, a partir de água de fontes alternativas de Curitiba e região metropolitana, correlacionando com potencial risco patogênico de consumo por seres humanos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Pesquisar o cloro livre nas amostras de água de fontes alternativas pelo método da orto-tolidina.
- Quantificar coliformes totais nas amostras de água de fontes alternativas pelo método de tubos múltiplos e método do substrato cromogênico.
- Quantificar coliformes termotolerantes nas amostras de água de fontes alternativas pelo método de tubos múltiplos.
- Quantificar *E. coli* nas amostras de água de fontes alternativas pelo método do substrato cromogênico.
- Quantificar *Enterococcus* spp nas amostras de água de fontes alternativas de pelo método de membrana filtrante em meio de cultura clássico e cromogênico.

- Quantificar bactérias termotolerantes com atividade enzimática nas amostras de água de fontes alternativas pelo método do substrato cromogênico.
- Determinar acurácia, sensibilidade e especificidade dos métodos cromogênicos empregados para quantificação de coliformes totais e *Enterococcus* spp nas amostras de água de fontes alternativas.
- Avaliar a potabilidade de água de fontes alternativas de Curitiba e região metropolitana.
- Pesquisar fatores de virulência dos isolados de *E. coli* e *Enterococcus* spp através de métodos fenotípicos e genotípicos.
- Avaliar o perfil de resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de *E. coli* e *Enterococcus* spp através do método de disco-difusão.
- Correlacionar os isolados de *E. coli* e *Enterococcus* spp com a potabilidade da água e o potencial risco patogênico de consumo por seres humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FONTES DE CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA

Segundo Amaral (2006) citado por Marques *et al.* (2008), a contaminação das águas subterrâneas deve-se à construção desordenada de poços particulares, da infiltração de excretos provenientes de fossas sépticas e redes de esgoto com manutenção deficiente, infiltração de compostos tóxicos de depósitos industriais e vertedores de lixo, além da utilização indevida de antigas cacimbas transformadas em fossas.

2.2 INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO DA ÁGUA

O conceito de organismos "indicadores" foi introduzido em 1892 e atualmente serve de base para muitos padrões de qualidade microbiológica em água. A ausência de organismos indicadores não é eficaz para predizer a ausência de bactérias oportunistas ou vírus e protozoários tais como *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium*, que podem ser mais resistentes à desinfecção. O termo micro-organismos indicadores caracteriza que a água está poluída com material fecal de origem humana ou de outros animais de sangue quente. Este tipo de poluição indica que qualquer micro-organismo patogênico presente no trato intestinal desses animais pode também estar presente na água. São características importantes de um organismo indicador: estar presente em águas poluídas e ausentes em águas não poluídas (potável); estar presente na água quando os micro-organismos patogênicos estão presentes; o número de micro-organismos indicadores está correlacionado com o índice de poluição; sobreviver melhor e por mais tempo na água do que micro-organismos patogênicos; apresentar propriedades uniformes e estáveis; geralmente é inofensivo ao homem e a outros animais; estar presente em maior número do que os patogênicos e, ser facilmente evidenciado por técnicas laboratoriais padronizadas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.2.1 Coliformes totais

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família Enterobacteriaceae que inclui 44 gêneros e 176 espécies (SILVA *et al.*, 2010). O grupo inclui também diversos gêneros e espécies não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas*, portanto sua enumeração em água e alimentos é menos representativa, como indicador de contaminação fecal, do que a enumeração de coliformes fecais ou *E. coli* (SILVA *et al.*, 2005).

A OMS define coliformes totais como bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, capazes de crescer na presença de concentrações relativamente altas de sais biliares capazes de fermentar a lactose entre 35° a 37°C com produção de ácido, gás e aldeído, dentro de 24 horas. Além da fermentação da lactose, coliformes totais produzem a enzima β -D-galactosidase. Tradicionalmente o grupo coliforme é associado a pertencerem aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, mas o grupo é mais heterogêneo e incluem uma gama maior de gêneros, como *Serratia* e *Hafnia*. Este grupo inclui ambas, espécies fecais e ambientais (WHO, 2006).

Dentre as enterobactérias catalogadas, a incidência de bactérias que possuem atividade β -D-galactosidásica é de 65% ao passo que as que fermentam a lactose estão em 32%, Apêndice (MURRAY *et al.*, 2007; HOLT, 2000).

A legislação brasileira, Portaria MS nº 518/2004, define coliformes totais como bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase negativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos que fermentam a lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β -D-galactosidase (BRASIL, 2004).

Outros autores definem coliformes totais conforme o método de análise empregado para quantificação e isolamento dos micro-organismos. Assim, quando a técnica de fermentação é usada, o grupo é definido como todo anaeróbio facultativo, Gram-negativo, não formador de esporo, bacilo que fermenta a lactose com formação de gás, acetaldeído e ácido dentro de 48 h a 35°C. Caso os tubos múltiplos sejam utilizados, o resultado da análise de tubos em replicata e diluições é

reportado em número mais provável (NMP/100mL). Quando culturas purificadas de bactérias coliformes são testadas, o grupo é citocromo-oxidase negativo e β -D-galactosidase positiva. O resultado é reportado em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de coliformes/100mL. Porém, quando a técnica enzimática é utilizada, o grupo coliforme é definido como bactérias que possuem a enzima β -D-galactosidase, a qual cliva substratos cromogênicos como o orto-nitrofenil- β -D-galactopiranoside (ONPG), ou o 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranoside (X-GAL), ou, ainda o clorofenol-vermelho- β -D-galactopiranoside (CPRG) (EATON *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que além das enterobactérias, diversas outras bactérias Gram-negativas, não fastidiosas apresentam atividade β -D-galactosidásica, incluindo *Vibrio*, *Aeromonas*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Elizabethkingia*, *Chryseobacterium*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter* (MURRAY *et al.*, 2007; HOLT, 2000).

Como as bactérias coliformes, os vírus entéricos podem ser carregados juntamente com os dejetos humanos para a água. A análise de uma amostra de água para a presença de vírus requer métodos mais elaborados do que aqueles utilizados para isolamento de bactérias. Embora existam pesquisas em andamento nesta área, nenhum "método-padrão" para detecção de vírus na água tem sido adotado (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

De acordo com a Portaria MS nº 518/2004, as amostras com resultados positivos para coliformes totais devem ser analisadas para *E. coli* ou coliformes termotolerantes (BRASIL, 2004).

2.2.2 Coliformes termotolerantes

O grupo coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás (SILVA *et al.*, 2010).

Em 1904, Eijkman propôs a formação de gás a partir da glicose a 46°C como um teste para coliformes de origem fecal. Muitos organismos não pertencentes ao

gênero, definidos previamente como bactérias coliformes podem produzir gás a partir da glicose. Por esta razão, o teste foi imediatamente modificado para especificar aqueles organismos que produzem gás a partir da lactose. O teste para coliformes fecais foi modificado adicionalmente para realizar a incubação a 44,5°C. As bactérias pertencentes a este grupo são predominantemente *E. coli*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella pneumoniae*. Entretanto, algumas outras espécies e cepas de outros gêneros darão resultados positivos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.2.3 *E. coli*

E. coli está incluída tanto no grupo de coliformes totais, quanto no dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora possa ser introduzida nos alimentos através de fontes não fecais (SILVA *et al.*, 2010). Cerca de 95% dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais são *E. coli* (SILVA *et al.*, 2005).

O uso de *E. coli* como indicador de contaminação de origem fecal presentes em água foi proposto em 1892, uma vez que esse micro-organismo é encontrado no conteúdo intestinal do homem e animais de sangue quente. O micro-organismo é utilizado como indicador, por satisfazer as exigências de um indicador de poluição. Outras bactérias têm sido sugeridas e algumas vezes utilizadas como indicadores de poluição, entre elas *Enterococcus* spp e *Clostridium perfringens*; ambas são habitantes normais do intestino grosso do homem e de outros animais. Existe também considerável interesse no desenvolvimento de uma metodologia de rotina para a evidenciação de um vírus como indicador de poluição. Usados como indicadores de desinfecção e é mais sensível à desinfecção do que vírus entéricos e protozoários (WHO, 2006; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A bactéria *E. coli* pode ser diferenciada de outros coliformes pela capacidade de produzir indol a partir do triptofano ou pela produção da enzima β -D-glucuronidase (GUD), uma enzima que hidrolisa a ligação glucuronosil do conjugado glucuronide tais como MUG. Dentre as Enterobacteriaceae, *E. coli*, algumas cepas de *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia* produzem a enzima capaz de hidrolisar os

conjugados glucuronide. Baseado na produção desta enzima, testes para a detecção e enumeração de *E. coli* foram desenvolvidos (EATON *et al.*, 2005).

2.2.4 *Enterococcus* spp

Enterococcus spp são empregados como indicador de contaminação de origem fecal na água. São mais resistentes aos fatores ambientais do que as enterobactérias e podem sobreviver em condições onde as enterobactérias não sobreviveriam (SILVA *et al.*, 2010).

O gênero *Enterococcus* pertence à ordem Bacillales, família Enterococcaceae e anteriormente eram classificados como *Streptococcus* do grupo D. Estes micro-organismos são residentes normais do trato gastrointestinal e biliar, podendo ser encontrado em região vaginal e uretral masculina. *E. faecalis* é a espécie mais isolada em amostras clínicas e está associado a 80-90% das infecções enterocócicas humanas. *E. faecium*, que ocupa o segundo lugar, é isolado de 10-15% das infecções (WINN *et al.* 2008).

São cocos Gram-positivos, catalase e oxidase-negativas, cujas principais características diferenciais são a capacidade de hidrolisar a esculina, crescer a 10°C e 45°C e na presença de 2% de bile. São capazes de crescer em pH 9,6 e na presença de 6,5% de cloreto de sódio (SILVA *et al.*, 2010). Estas propriedades básicas podem ser utilizadas para distinguir *Enterococcus* spp de outros cocos Gram-positivos, catalase negativos. Outros testes fenotípicos podem ser utilizados na identificação do gênero e diferenciação de *Enterococcus* spp, como por exemplo reações de fermentação, hidrólise da L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (PYR), motilidade e produção de pigmento (MURRAY *et al.*, 2007).

2.2.5 Atividade enzimática dos indicadores de contaminação

A capacidade de detectar a presença de uma enzima específica e exclusiva com substratos adequados levou ao desenvolvimento de um grande número de métodos para a identificação de micro-organismos, mesmo em meios de isolamento primário. A incorporação de tais substratos em um meio seletivo pode eliminar a

necessidade de subcultura e testes bioquímicos adicionais para estabelecer a identidade de certos micro-organismos. Estes ensaios enzimáticos podem constituir um método alternativo para pesquisar *E.coli*, coliformes e *Enterococcus* spp em água, além de ser específico, sensível e rápido de ser executado no laboratório (MANAFI, 1998).

A enzima β -D-galactosidase catalisa a hidrólise do substrato cromogênico galactopiranoside, liberando a porção cromófora. Como exemplos de substratos cromogênicos têm ONPG (o-nitrofenil- β -D-galactopiranoside) que fica amarelo, X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranoside) que fica azul, MUGAL (4-metil-umbeliferil- β -D-galactopiranoside), produzindo fluorescência quando exposto à luz UV (ultravioleta). A β -D-galactosidase catalisa a hidrólise da lactose em galactose e glicose e pode ser usado para caracterizar o grupo coliforme dentro da família Enterobacteriaceae (MANAFI, 1998).

A enzima β -D-glucuronidase (GUD), também denominado β -D-glucuronosohidrolase é uma enzima que catalisa a hidrólise de ácidos β -D-glucopiranosidurônicos em seus correspondentes agliconas e ácido D-glucurônico e sua atividade é medida usando-se diferentes substâncias cromogênicas como p-nitrofenil- β -D-glucuronide (PNPG), ou 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronide (XGLU), ou fluorogênicas como 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronide (MUG). GUD está presente em 94-96% de cepas de *E.coli* (MANAFI, 1998).

A adição do cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glicoside (X-GLIC) em meios de cultura resulta na produção de um complexo azul índigo insolúvel por *Enterococcus* spp que possuem a enzima β -D-glicosidase, que difunde ao redor do meio sólido, formando um halo ao redor da colônia. Certos coliformes como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* também possuem atividade β -D-glicosidásica formando colônias azuis no meio cromogênico contendo o substrato (MANAFI, 1998).

2.3 PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ÁGUA POTÁVEL

De acordo com o Artigo 11 da Portaria n° 518/2004 do Ministério da Saúde (MS), o padrão microbiológico da água para consumo humano incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes deve ser ausência de *E. coli* ou coliformes termotolerantes em 100 mL de amostra, sendo que a detecção de *E. coli* deve ser preferencialmente adotada, Tabela 1 (BRASIL, 2004).

O Ministério da Saúde, através da Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n° 275/2005, estabelece como características microbiológicas de água mineral natural e água natural, pesquisa de *E. coli* ou coliforme (fecais) termotolerantes e coliformes totais em 100 mL de amostra, além da ausência em 100 mL de amostra de *Enterococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e, clostrídios sulfito redutores ou *Clostridium perfringens* (BRASIL, 2005).

TABELA 1 - PADRÃO MICROBIOLÓGICO DE POTABILIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

PARÂMETRO	VMP ⁽¹⁾
Água para consumo humano ⁽²⁾ <i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100 mL
Água na saída do tratamento Coliformes totais	Ausência em 100 mL
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede) <i>Escherichia coli</i> ou coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100 mL
Coliformes totais	Sistemas que analisam até 40 amostras por mês: Ausência em 100 mL em 95% das amostras examinadas no mês; Sistemas que analisam mais de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100 mL

LEGENDA: (1) - Valor Máximo Permitido; (2) - inclui fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras; (3) - a detecção de *E. coli* deve ser preferencialmente adotada

FONTE: Brasil (2004)

2.4 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Para a avaliação microbiológica da água recomenda-se o uso de métodos que detectem micro-organismos indicadores e agentes oportunistas. As técnicas rotineiras para contagem de micro-organismos indicadores são, número mais

provável (NMP) e filtração em membrana. O teste de presença-ausência é recomendado para pesquisa e os meios de cultura designados são seletivos para o crescimento e identificação específica para o grupo de micro-organismos pesquisados. Geralmente também são usados inibidores, temperaturas restritas, e/ou nutrientes limitados para restringir crescimento de espécies não desejadas. Um breve descritivo de cada técnica é dado a seguir:

2.4.1 Número mais provável (NMP)

Método de análise quantitativo que permite determinar o NMP do(s) micro-organismo (s) alvo na amostra, através da inoculação de alíquotas dessa amostra em uma série de tubos, também chamado tubos múltiplos, contendo um meio de cultura líquido adequado para o seu crescimento. A determinação do número de micro-organismos baseia-se no princípio de que numa amostra líquida, as bactérias podem ser separadas por agitação, estando uniformemente distribuídas. Cada tubo é analisado para uma resposta positiva indicativa de crescimento do micro-organismo pesquisado (SILVA, *et al.*, 2005).

Baseado no número de tubos positivos, o resultado da contagem é dado pelo uso de tabela determinada estatisticamente, em NMP/mL. A Tabela 2 ilustra os dados estatísticos quando usado uma série de 10 tubos com 10 mL cada. A Tabela 3 ilustra os dados estatísticos quando usada uma série de cinco tubos com 20 mL cada. A tabela 4 é usada para diversas combinações de tubos positivos em séries de 5 tubos com quantidade inoculada de amostra: 10,0; 1,0 e 0,1 mL. O limite de confiança do método é de 95% (EATON *et al.*, 2005).

O teste NMP para pesquisa de coliformes em água potável está baseado na definição de coliformes utilizado pela Organização Mundial da Saúde. Presume-se que o coliforme esteja presente quando produz gás (e ácido) em meios de cultura contendo lactose, a 35°C em 24 a 48 horas. Em seguida sua presença é confirmada quando produz gás em 24 a 48 horas no meio de verde brilhante bile lactose. Os quatro meios de cultura recomendados para a fase presuntiva são o meio de glutamato minerais modificado, caldo lauril triptose, caldo MacConkey e caldo

lactose. Novos regulamentos também permitem o uso do caldo presença-ausência púrpura de bromocresol (EATON *et al.*, 2005).

A confirmação de coliformes termotolerantes é realizada no caldo EC (*E. coli*), incubada a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e a confirmação presuntiva para *E. coli* utiliza o teste de indol, pós crescimento em caldo triptona a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ (SILVA *et al.*, 2010).

E. coli pode ser identificada através de testes bioquímicos ou através do método baseado na produção da enzima GUD pela bactéria. A GUD atua sobre o 4-metil-umbeliferil- β -D-glucuronide. A evidência de fluorescência quando submetido à luz ultravioleta (UV) indica teste positivo para *E. coli* (SILVA *et al.*, 2010).

A contagem de *Enterococcus* spp é recomendada para águas e sedimentos de esgotos. Pode-se usar este método também para água do mar. O meio de cultura recomendado pela Associação Americana de Saúde Pública (APHA) para tubos múltiplos é o caldo azida dextrose (EATON *et al.*, 2005).

TABELA 2 – NMP/mL PARA 10 PORÇÕES DE 10 mL

Positivo	Negativo	NMP/100mL
0	10	< 1,1
1	9	1,1
2	8	2,2
3	7	3,6
4	6	5,1
5	5	6,9
6	4	9,2
7	3	12,0
8	2	16,1
9	1	23,0
10	0	>23,0

FONTE: EATON *et al.* (2005)

TABELA 3 – NMP/mL PARA 5 PORÇÕES DE 20 mL

Positivo	Negativo	NMP/100mL
0	5	< 1,1
1	4	1,1
2	3	2,6
3	2	4,6
4	1	8,0
5	0	> 8,0

FONTE: EATON *et al.* (2005)

TABELA 4 - NMP/mL PARA DIVERSAS COMBINAÇÕES DE TUBOS POSITIVOS EM 3 SÉRIES DE 5 TUBOS

Combinação de positivos	Limite de confiança			Combinação de positivos	Limite de confiança		
	NMP/100mL	Baixo	Alto		NMP/100mL	Baixo	Alto
0-0-0	<1,8	-	6,8	4-0-3	25	9,8	70
0-0-1	1,8	0,09	6,8	4-1-0	17	6	40
0-1-0	1,8	0,09	6,9	4-1-1	21	6,8	42
0-1-1	3,6	0,70	10	4-1-2	26	9,8	20
0-2-0	3,7	0,70	10	4-1-3	31	10	70
0-2-1	5,5	1,80	15	4-2-0	22	6,8	50
0-3-0	5,6	1,80	15	4-2-1	26	9,8	70
1-0-0	2,0	0,10	10	4-2-2	32	10	70
1-0-1	4,0	0,70	10	4-2-3	38	14	100
1-0-2	6,0	1,80	15	4-3-0	27	9,9	70
1-1-0	4,0	0,71	12	4-3-1	33	10	70
1-1-1	6,1	1,8	15	4-3-2	39	14	100
1-1-2	8,1	3,4	22	4-4-0	34	14	100
1-2-0	6,1	1,8	15	4-4-1	40	14	100
1-2-1	8,2	3,4	22	4-4-2	47	15	120
1-3-0	8,3	3,4	22	4-5-0	41	14	100
1-3-1	10,0	3,5	22	4-5-1	48	15	120
1-4-0	10,0	3,5	22	5-0-0	23	6,8	70
2-0-0	4,5	0,79	15	5-0-1	31	10	70
2-0-1	6,8	1,8	15	5-0-2	43	14	100
2-0-2	9,1	3,4	22	5-0-3	58	22	150
2-1-0	6,8	1,8	22	5-1-0	33	10	100
2-1-2	12,0	4,1	26	5-1-1	46	14	120
2-2-0	9,3	3,4	22	5-1-2	63	22	150
2-2-1	12,0	4,1	26	5-1-3	84	34	230
2-2-2	14,0	5,9	36	5-2-0	49	15	150
2-3-0	12,0	4,1	26	5-2-1	70	22	170
2-3-1	14,0	5,9	36	5-2-2	94	34	230
2-4-0	15,0	5,9	36	5-2-3	120	36	250
3-0-0	7,8	2,1	22	5-2-4	150	58	400
3-0-1	11,0	3,5	23	5-3-0	79	22	230
3-0-2	13,0	5,6	35	5-3-1	110	34	250
3-1-0	11,0	3,5	26	5-3-2	140	52	400
3-1-1	14,0	5,6	36	5-3-3	170	70	400
3-1-2	17,0	6,0	36	5-3-4	210	70	400
3-2-0	14,0	5,7	36	5-4-0	130	36	400
3-2-1	17,0	6,8	40	5-4-1	170	58	400
3-2-2	20,0	6,8	40	5-4-2	220	70	440
3-3-0	17,0	6,8	40	5-4-3	280	100	710
3-3-1	21,0	6,8	40	5-4-4	350	100	710
3-3-2	24,0	9,8	70	5-4-5	430	150	1100
3-4-0	21,0	6,8	40	5-5-0	240	70	710
3-4-1	24,0	9,8	70	5-5-1	350	100	1100
3-5-0	25,0	9,8	70	5-5-2	540	150	1700
4-0-0	13,0	4,1	35	5-5-3	920	220	2600
4-0-1	17,0	5,9	36	5-5-4	1600	400	4600
4-0-2	21,0	6,8	40	5-5-5	>1600	700	-

FONTE: EATON *et al.* (2005)

2.4.2 Filtração em membrana

A técnica de filtração em membrana pode ser usada para testar um volume relativamente grande de amostra e fornece o resultado numérico mais rapidamente do que o teste de tubos múltiplos. É realizada pela filtração de um volume apropriado através de uma membrana filtrante, cujo tamanho do poro, 0,45mm, é suficientemente pequeno para reter os organismos pesquisados. O limite de detecção é de uma unidade formadora de colônia (UFC) por volume inoculado, sendo indicado para amostras com contagem abaixo do limite de detecção dos outros procedimentos. O volume padrão a ser filtrado de água potável é de 100 mL. Então o filtro é colocado em um meio sólido apropriado ou uma almofada saturada com o meio em caldo e incubado. Se o organismo pesquisado estiver presente, colônias crescerão sobre a membrana. As colônias típicas são contadas e o número é reportado como unidades formadoras de colônias por 100 mL de amostra (UFC/100mL) (SILVA *et al.*, 2010).

Para análise de coliformes totais os meios de cultura que podem ser usados são o ágar Endo LES e caldo m-Endo. O indicador fucsina sulfito é usado no meio m-Endo para indicar a presença de aldeído formado a partir da fermentação da lactose. O indicador torna-se vermelho na presença do aldeído. A membrana é colocada sobre o meio m-Endo e incubada por 24 horas a 35° a 37°C. Coliformes (colônias fermentadoras de lactose) ficam vermelhas com um brilho verde dourado sobre a membrana. As colônias são contadas e relatadas como presuntivo para coliformes (EATON *et al.*, 2005).

Para a pesquisa de coliformes termotolerantes, um meio seletivo e uma temperatura de incubação elevada são usados para inibir o crescimento de coliformes não fecais. O meio a ser utilizado é o m-FC em ágar ou caldo. Quando coliformes fecais crescem sobre a membrana formam um ácido que reage com o azul de anilina (um corante) para dar uma coloração azul. Neste teste a membrana é colocada sobre o meio e incubada por 24 horas a 44,5°C. A formação de colônias azuis é considerada resultado positivo (EATON *et al.*, 2005).

Sloat e Ziel (1992) propuseram um teste baseado no fato de que a maioria dos coliformes termotolerantes, com exceção de *E. coli*, é urease positiva. Este método utiliza o meio m-TEC que favorece o crescimento de coliformes ao mesmo

tempo diferencia *E. coli* pelo teste de urease no próprio meio. *E. coli* não apresenta reação positiva característica, ficando amarela. Este método é recomendado para determinar *E. coli* em águas recreacionais.

A técnica de filtração em membrana para *Enterococcus* spp é útil para a pesquisa em águas naturais e água marinha. O meio de cultura proposto pela Associação Americana de Saúde Pública é o m-E ágar. Este meio contém esculina a qual é hidrolisada por *Enterococcus* spp. O meio também contém ácido nalidíxico e azida sódica para selecionar bactérias Gram-positivas. A actidiona é colocada para inibir fungos. O cloreto de trifetil tetrazólio adicionado no meio, cuja redução muda a coloração das colônias, é usado para diferenciar *Enterococcus* spp de outros estreptococos (EATON *et al.*, 2005).

2.4.3 Presença / Ausência

O teste presença-ausência (P-A) para o grupo coliforme é uma simples modificação do teste de tubos múltiplos, baseado no conceito de que indicadores de contaminação fecal não deverão estar presentes em 100 mL de amostra de água potável. A vantagem do método é ser possível processar um grande número de amostra por unidade de tempo. Quando comparado com o método de filtração em membrana também apresenta vantagem, pois quando o número de organismos é elevado, pode ocorrer sobreposição de colônias de coliformes e causar problemas na detecção (EATON *et al.*, 2005).

2.5 DOENÇAS RELACIONADAS À ÁGUA

Dados da OMS demonstram que 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento são ocasionadas pela contaminação da água e, a cada ano cinco milhões de pessoas, sendo que dois milhões são crianças entre 0 a 5 anos, morrem direta ou indiretamente pela falta ou deficiência dos sistemas de abastecimento de águas e esgotos (ANDRAUS, 2006; TEBBUTT, 1998).

O Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento propõe dentre os Objetivos de Desenvolvimento do Milênio a redução pela metade a proporção da população sem acesso permanente e sustentável à água potável segura até 2015. (PNUD, 2009).

Segundo Cantusio Neto, Santos e Franco (2008), o descarte do esgoto *in natura* nos mananciais, torna a água uma importante fonte dispersora de patógenos como vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos, liberados via fezes de indivíduos infectados contaminando o ambiente e causando assim um grande impacto na saúde pública.

Doenças relacionadas à exposição à água têm sido reportadas, mas a presença destes organismos em ambientes aquáticos urbanos ainda não está bem caracterizada (HIGGINS *et al.*, 2005).

Segundo Gelli (2001), os principais micro-organismos infecciosos, de ampla distribuição geográfica, encontrados com maior frequência como contaminantes de água potável são:

- a) Bactérias como *E. coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* e *Leptospira* spp;
- b) Vírus compreendidos nos grupos das adenoviroses, picornaviroses (enterovírus - vírus da Hepatite A), reoviroses (reovírus e rotavírus) e na família Norwalk;
- c) Protozoários como *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cyclospora cayetanensis*;
- d) Helmintos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenalis*, *Taenia solium* e *Strongyloides stercoralis*.

O consumo de água contaminada sempre foi preocupante. Em Portugal, durante o surto de cólera em 1974, o *Vibrio cholerae* foi isolado de duas nascentes que forneciam água para uma indústria envasadora, aparentemente contaminada por uma infiltração de esgoto através do estrato calcário (ROSENBERG, 2003). Em Londres, em meados do século XIX, um grave problema de saúde pública, um grande surto de cólera, fez com que a então Rainha Victória cobrasse das autoridades de saúde uma investigação completa sobre o caso. Foi umas primeiras vezes na história da humanidade que se relacionou a disseminação de uma doença ao consumo de água (mesmo ainda desconhecendo-se a microbiologia) e este

trabalho foi considerado um dos marcos da epidemiologia e do saneamento básico (STARLING *et al.*, 2005). Um caso clássico de intoxicação por mercúrio ocorreu em 1953, na cidade de Minamata, no Japão, quando 79 pessoas morreram em consequência direta da intoxicação por mercúrio. Uma indústria local utilizava um composto de mercúrio que, ao atingir a baía de Minamata, incorporava-se à cadeia alimentar dos peixes. E consequentemente, causava doenças às pessoas que o consumiam (BRASIL, 2010). Em 1993, com a ocorrência do grande surto de criptosporidiose em Milwaukee, nos Estados Unidos, veiculado pela água, em que 403.000 pessoas foram afetadas e 50 óbitos, o micro-organismo foi reconhecido como ameaça para a saúde pública (MARTINS-VIEIRA; BRITO; HELLER, 2009).

Dentre os casos de cólera no Brasil, os primeiros casos da sétima pandemia foram registrados em abril de 1991, no Estado do Amazonas, nos municípios de Benjamin Constant e Tabatinga, ambos na fronteira com Colômbia e Peru, em decorrência da grande pressão de transmissão procedente de Letícia, na Colômbia, e de Iquitos, no Peru, e, a partir destes casos, alastrou-se pelo país. Entre 15 de abril de 1991 e 31 de março de 1996, foram notificados ao Ministério da Saúde 154.415 casos na região Sul foram registrados apenas seis casos da doença, em um surto familiar ocorrido em 1993, no Estado do Paraná (GEROLOMO; PENNA, 1999). De acordo com o Ministério da Saúde, um surto de cólera ocorreu na cidade de São Bento do Una, no estado de Pernambuco, nos anos de 2004 e 2005, totalizando 26 casos, embora os últimos casos notificados no Brasil tenham sido em 2001 (BRASIL, 2011).

Um exemplo clássico e grave dos problemas relacionados à contaminação por cianotoxinas no Brasil ocorreu no município de Caruaru em Pernambuco, em 1996, onde numa clínica de hemodiálise ocorreram 123 casos com 54 óbitos, após o contato com água contaminada por cianotoxinas (ANDRADE *et al.*, 2009). Em Itaparica na Bahia, em 1988, a intoxicação de 2000 pessoas, dentre as quais 88 faleceram, após a ingestão de água do reservatório, também demonstraram fortes indícios de contaminação por cianotoxinas (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

No Paraná, de acordo com a Secretaria do Estado da Saúde os principais surtos por veiculação hídrica foram por *Shigella* em Rio Branco do Sul (1981) com 2 óbitos, gastroenterites em Engenheiro Beltrão (1981) com 851 casos, surto de hepatite em Paranaguá (1983) com 217 casos sorologicamente confirmados, ciclóspara em Antonina (2001) com cerca de 600 casos, toxoplasmose em Santa

Isabel do Ivaí (2002) com 600 casos, sendo 176 confirmados, relatado como único caso na literatura mundial e, hepatite A em Palmas (2007) com 52 casos onde 42 foram confirmados (PARANÁ, 2011).

2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

Fatores de virulência bacterianos são substâncias ou estruturas celulares que contribuem para a patogenicidade das bactérias, tais como toxinas, enzimas extracelulares, adesinas, sideróforos, fímbrias, flagelos e cápsula. A emergência de linhagens genéticas com virulência realçada se deve à aquisição de novas características por troca genética. Este intercâmbio genético envolve uma diversidade de elementos genéticos, tais como SCCmec, com 52-kb codificando para meticilina resistência em *Staphylococcus aureus*; ilhas de patogenicidade em diversas espécies codificando toxinas; adesões e outros fatores de virulência associados; conversão de fagos para produção de toxinas; e aquisição de fatores de virulência em plasmídios e transposons (PELCZAR JUNIOR *et al.*, 1996; MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

2.6.1 Patogenicidade de *E. coli*

E. coli teve um lugar central na microbiologia da água por décadas como um indicador da poluição fecal. É relativamente recente a discussão do papel desse micro-organismo como patógeno, ao invés de indicador de potabilidade da água. O interesse no papel de *E. coli* como causa da doença diarreiogênica aumentou por causa da emergência de *E. coli* O157:H7 e *E. coli* enterohemorrágica, principalmente devido à severidade da doença relacionada (HUNTER, 2003).

Cada tipo de *E. coli* causa doença diarreica através de diferentes mecanismos e apresentando manifestações clínicas diferente. Hunter (2003) discutiu cada um destes tipos e igualmente descreveu sua epidemiologia, com particular referência se são ou não de origem na água.

Além de doenças intestinais, cepas especializadas possuem arsenal de virulência requerido para virulência extra-intestinal tais como, infecções do trato urinário (UPEC), septicemia e meningite (MENEC) (SOTO *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2006).

2.6.1.1 *E. coli* diarreio gênicas

E. coli diarreio gênicas (DEC) são importante causa de doenças gastrointestinais e são classificadas em seis grupos de acordo com a presença de genes de virulência: *E. coli* enteropatogênica (EPEC) possui os genes *eae* e *bfpA*, os quais codificam adesinas; *E. coli* produtora de toxina Shiga possui os genes *stx1* e/ou *stx2*, codificadoras das toxinas Shiga; *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) possui os genes *lt* e/ou *st*, que codificam para as toxinas LT e ST, respectivamente; *E. coli* enteroinvasora (EIEC) possui os genes *ial/ipaH*, que estão associados com invasão; *E. coli* enteroagregativa (EAEC) que possui o plasmídio de virulência CVD432 e a *E. coli* de aderência difusa (DAEC) que possui o gene *daaE* que codifica uma fímbria (FIALHO, 2008).

A sorotipagem de *E. coli* baseia-se nos seus antígenos de superfície O (somático), H (flagelar) e K (capsular). A combinação dos antígenos O e H define um sorotipo, como por exemplo a *E. coli* O157:H7 (WINN *et al.*, 2008).

Estes patógenos têm sido associados a casos de diarreia média a severa em adultos e crianças, principalmente em países em desenvolvimento (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000) propuseram classificação filogenética de *E. coli* em A, B1, B2, e D, descrevendo um método simples baseado em PCR que usa a combinação de genes *chuA* e *yjaA* e fragmentos de DNA TSPE4.C2. As cepas patogênicas intestinais geralmente pertencem aos grupos A, B1 e D (PUPO *et al.*, 1997).

Orsi *et al.* (2007, 2008), avaliaram a distribuição filogenética de *E. coli* isolados da água potável sugerindo que métodos baseados em PCR possam ser usados para uma rápida associação de cepas potencialmente patogênicas em amostras de água.

Embora o número de *E. coli* em água superficial possa diferir grandemente entre as localizações, conhece-se relativamente pouco sobre a distribuição de *E. coli* patogênica em água superficial usada como fontes de consumo ou recreação (HAMELIN *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que uma linhagem avirulenta de *E. coli* pode tornar-se virulenta devido à transferência de genes de virulência, seja por conjugação, transdução ou transformação e causar doenças intestinais (Figura 1) (BARON, 1996).

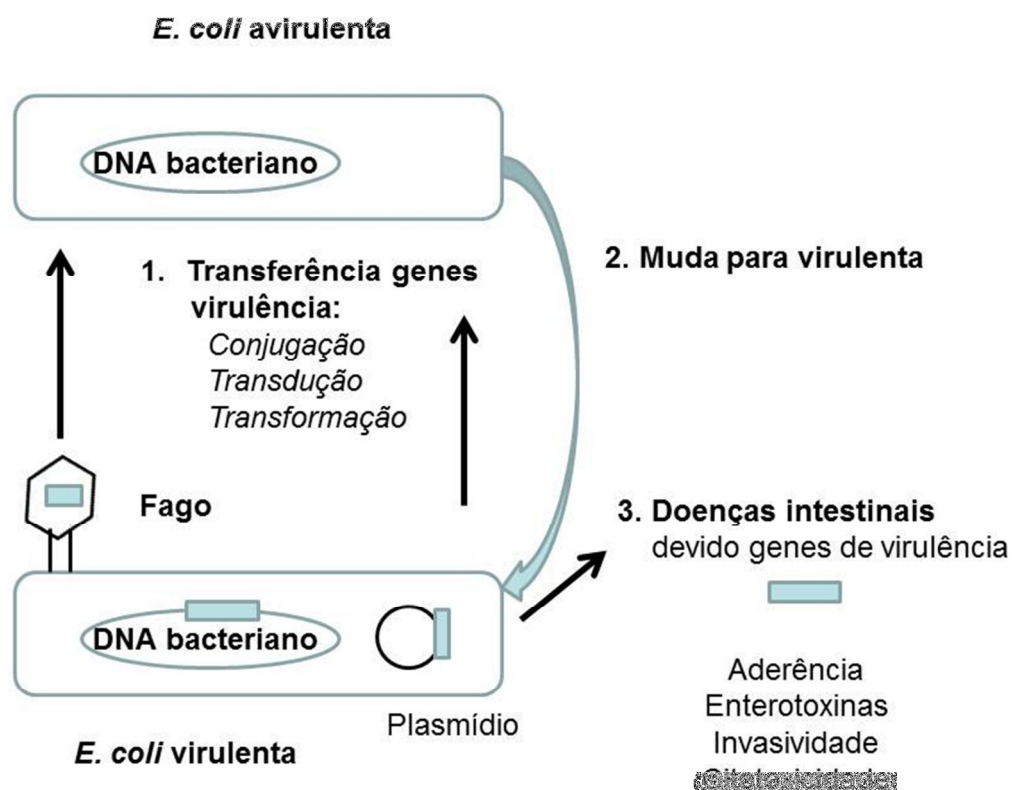


FIGURA 1 – MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DE GENES DA VIRULÊNCIA DE *E. coli*
FONTE – BARON (1996)

2.6.2 Patogenicidade de *Enterococcus* spp

Enterococcus spp apresentam baixa patogenicidade, no entanto causam complicadas infecções do trato urinário (ITU), bacterímia, endocardite, infecções

intra-abdominais e pélvicas, infecções de feridas e tecidos moles, sepse neonatal e, raramente meningite, muitas vezes comportando-se como agentes oportunistas em infecções hospitalares. Em geral a bacteremia enterocócica resulta da infecção de outros sítios, por exemplo, ITU, infecções do trato biliar, infecções gastrointestinais e geniturinárias e são mais frequentemente adquiridas em hospitais. (WINN *et al.*, 2008). As principais espécies causadoras de infecções no homem são *E. faecalis* e *E. faecium*, que apresentam resistência natural a diversos antimicrobianos, incluindo aztreonam, cotrimoxazol, clindamicina e cefalosporinas (TAVARES, 2000).

Mais pesquisas precisam ser realizadas para caracterizar as interações moleculares e celulares entre o hospedeiro e *Enterococcus* spp, que conduz à colonização e subsequente infecção, às interações entre as diversas proteínas bacterianas, transferências genéticas inter e intra-espécies, fatores de virulência em outras espécies além de *E. faecalis*, e guias de controle para infecção corrente (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Mundy, Sahm e Gilmore (2000), descreveram o surgimento da virulência enterocócica e resistência antimicrobiana, a princípio caracterizada no *E. faecalis* e mais tarde detectada com maior frequência em *E. faecium*.

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da bacteremia enterocócica incluem idade avançada, condições subjacentes como a diabetes, instrumentação prévia do trato respiratório, ou hospitalização prolongada e uso de antibióticos de amplo espectro com pouca ou nenhuma atividade contra os *Enterococcus* spp, p. ex., cefalosporinas. 5-20% dos casos de endocardite é habitualmente observada em pacientes de idade avançada com doença valvar subjacente ou com próteses valvares e, em geral, é de manifestação clínica subaguda (WINN *et al.*, 2008).

2.6.3 Fatores de virulência de *Enterococcus* spp

Enterococcus spp podem carrear diferentes genes que contribuem, direta ou indiretamente, à virulência (FRANZ *et al.*, 2001, 2003; ABRIQUEL *et al.*, 2008). *E. faecalis*, além de adquirir genes conferindo resistência a antibióticos, outros fatores de virulência também podem ser adquiridos por trocas genéticas, como por exemplo:

substância de agregação (*Agg*), gelatinase (*Ge/E*), proteína de superfície de *Enterococcus* spp (*Esp*), citolisina e adesinas. Pouco se sabe sobre a virulência entre *E. faecium*, no entanto, três genes de virulência em potencial têm sido descritos para esta espécie: *esp*, *hyl* e *acm* (LEAVIS *et al.*, 2004).

Dentre as espécies de *Enterococcus* existem diferentes graus para os fatores de virulência como observado no Quadro 1, para *E. faecalis* e *E. faecium*. Outros fatores fenotípicos que requerem futuras investigações incluem hialuronidase, ácidos lipoteicos, fibronectina e carboidratos de superfície (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Fator	Ocorrência	
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Resistência a antibióticos	+	++
Citolisina	+	-
Substâncias de agregação	+	Raro
Gelatinase	+	-
Superóxido extracelular	+	-
Proteína de superfície extracelular	+	-

QUADRO 1 - COMPARAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA CONHECIDOS EM ESPÉCIES DE *E. faecalis* e *E. faecium*

NOTA: ++ - muitos; + - alguns; - - nenhum

FONTE: MUNDY; SAHM; GILMORE (2000)

2.6.3.1 Citolisina / hemolisina

A citolisina é uma toxina protéica hemolítica modificada que ocorre em até 60% de *E. faecalis* isolados em investigação de surtos. A codificação do operon é realizada em um plasmídeo ou integrons no cromossomo bacteriano. Além das atividades de toxina, a citolisina de *E. faecalis* possui atividade de bacteriocina contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas. Em termos de diagnóstico, esta toxina provoca uma reação β -hemolítica no ágar sangue humano e cavalo (mas não hemolisa ágar sangue de ovelhas, que é freqüentemente utilizados em laboratórios de microbiologia clínica). Vários estudos têm sido realizados associando

a citolisina de *E. faecalis* à toxicidade da infecção enterocócica (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Cepas de *E. faecalis* produtoras de hemolisina têm mostrado virulência em modelos animais e infecções humanas e tem sido associado com aumento da severidade da infecção (VERGIS *et al.*, 2002).

2.6.3.2 Adesinas

A colonização do tecido do hospedeiro é considerada um passo primordial no processo de infecção bacteriana. As adesinas ajudam na colonização no tecido hospedeiro enquanto outras proteínas auxiliam na evasão das defesas, podendo assim, levar ao processo infeccioso (NALLAPAREDDY; WEINSTOCK; MURRAY, 2003).

A mucosa intestinal é considerada o principal sítio de entrada e disseminação do *E. faecalis* como patógeno hospitalar. Para ajudar a conceber métodos de prevenção de infecções em pacientes hospitalizados e entender melhor o mecanismo envolvido na colonização e invasão de *Enterococcus* spp, Sava *et al.* (2009) estudaram as glicosaminoglicanas, que estão presentes na superfície de células eucarióticas, como agente receptor para a adesão em *E. faecalis*.

Adesina do colágeno (Ace) é uma proteína recentemente identificada envolvida na aderência da bactéria às células do hospedeiro pela ligação ao colágeno, codificada pelo gene *ace*, designada de adesina do colágeno de *E. faecalis*. Segundo Singh *et al.* (2010), anticorpos humanos contra Ace inibem a aderência do colágeno de *E. faecalis*, indicando que a adesina é um importante fator de virulência e um alvo promissor para estratégias profiláticas e terapêuticas contra endocardites infecciosas por *E. faecalis*.

2.6.3.3 Gelatinase

Gelatinase é uma protease produzida por *E. faecalis*, capaz de hidrolisar a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos. A enzima que hidrolisa a caseína é também chamada de caseinase. Cepas de *E. faecalis* produtoras de gelatinase têm contribuído para a virulência de endocardites em modelos animais (VERGIS *et al.*, 2002; GUTSCHIK; MOLLER; CHRISTENSEN, 1979).

2.6.3.4 Outros fatores de virulência

Susbtância de agregação é uma proteína de superfície feromônio-induzível de *E. faecalis* que promove formação de agregado de acasalamento durante a conjugação bacteriana. Favorece o contato enterocócico entre doador e receptor para facilitar a transferência de plasmídios (KREFT *et al.*, 1992). Estudos têm demonstrado que a substância de agregação está associada à endocardite por este micro-organismo. A substância de agregação também está associado à destruição de tecido pulmonar e cardíaco. *In vivo*, substâncias de agregação podem contribuir para a patogênese de infecções enterocócicas através de um grande número de mecanismos, além de conferir adesão às células do tubo renal e aumenta a internalização de *E. faecalis* em células intestinais humanas, conforme experimentos realizados em cultivo celular (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

Rakita, Vanek e Jacques-Palaz (1999) demonstraram *in vitro* que a substância de agregação também promove ligação direta de *E. faecalis* em neutrófilos humanos, independentemente da presença da opsonina, via receptores do complemento do tipo 3 e outros receptores na superfície do neutrófilo, porém esta substância parece promover a sobrevivência de *E. faecalis* em neutrófilos.

A produção de superóxido extracelular está associada com virulência de *Enterococcus* spp em bacterímia (SHANKAR *et. al.*, 1999). Muitas cepas geram substancial superóxido extracelular, com produção significativamente maior pelas cepas invasivas do que cepas comensais. A produção de superóxido extracelular também foi observada aumentada em infecções mistas de *E. faecalis* associadas com *Bacteroides fragilis* num modelo de infecção subcutânea (HUYCKE; GILMORE, 1997).

A proteína de superfície celular (Esp) inicialmente derivou de cepas clínicas de *E. faecalis vanB* (SAHM *et al.*, 1989). Shankar *et al.* (1999) detectaram *esp* através de amplificação por PCR somente em 3% dos isolados de fezes, no entanto 41% de *E. faecalis* isolados do sangue e 42% de *E. faecalis* isolados de endocardite continham esta proteína. O gene não foi detectado em isolados de *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ou *E. raffinosus*.

2.7 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (TAVARES, 2000).

A resistência antimicrobiana é uma ameaça grave na medicina veterinária e nos cuidados médicos do homem. Os genes de resistência podem se espalhar entre os animais e, através da cadeia alimentar retornar aos humanos (SALHSTROM *et al.*, 2009).

Doenças diarreicas raramente requerem tratamento antimicrobiano e pode ser prevenida por melhoria das condições de vida, no entanto antimicrobianos, que são amplamente disponíveis sobre o balcão e através de outros estabelecimentos não regulamentados num certo número de países em desenvolvimento, continuam a ser um esteio da terapêutica empírica. Esta ampla utilização indevida diminui a eficácia de medicamentos financeiramente acessíveis e disponíveis, o que representa um sério problema quando é necessário o tratamento antimicrobiano. (Wise *et al.* 1998; WHO 1999), citado por KARIUKI, 2010, p. 177.

Os antibióticos são inativados por ação de enzimas degradadoras, por ação de enzimas que alteram os antibióticos e também por sistema de bomba de efluxo, que faz com que o antibiótico seja eliminado do interior da célula, conforme demonstrado na Figura 2 (FARREL, 2009; BYARUGABA, 2010).

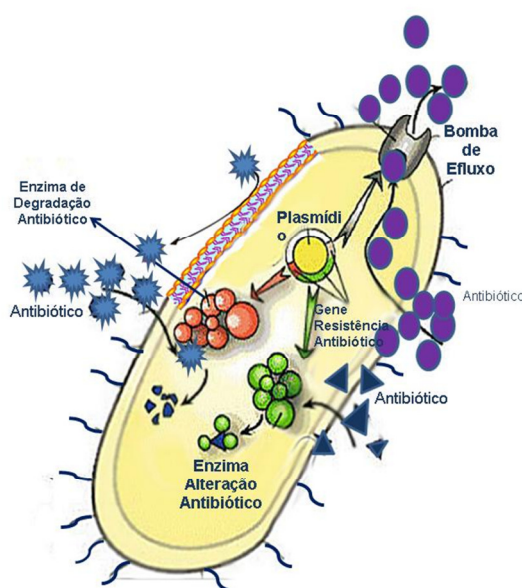


FIGURA 2 – PANORAMA PARA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS
FONTE: BYARUGABA (2010)

2.7.1 Beta-lactamase (β -lactamase)

Enzimas β -lactamases agem quebrando o anel β -lactâmico das drogas derivadas da penicilina (SILVA, 2000).

Enterococcus spp são, na maioria das vezes, resistentes à atividade de penicilina e outros β -lactâmicos e esta propriedade os diferencia da maioria dos *Streptococcus* spp que, em geral, são sensíveis às concentrações mais baixas de β -lactâmicos. Embora rara, a resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *E. faecalis* é frequentemente mediada pela produção da enzima β -lactamase. Por outro lado, a resistência aos β -lactâmicos na maioria dos isolados clínicos de *E. faecium* está associada com mutação ou superprodução de PBP5. A emergência de resistência a β -lactâmicos impede o uso destes componentes para o tratamento de infecções enterocócicas severas (ARIAS; CONTRERAS; MURRAY, 2010).

Plasmídios que carregam os genes de β -lactamase, frequentemente carregam genes de resistência de outras classes de antimicrobianos, como as sulfonamidas e aminoglicosídeos (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

2.7.2 Resistência antimicrobiana de *E. coli*

Segundo Brueggemann (2006), existem quatro maneiras para *E. coli* resistir aos efeitos de antibióticos:

- a) Produção de enzimas que inativam ou modificam os antibióticos, como as β -lactamases, que inativam as drogas pela clivagem da estrutura anelada dos β -lactâmicos;
- b) Restrição da concentração de antibióticos dentro da célula reduzindo a permeabilidade da membrana e restringindo a entrada de uma ampla gama de antibióticos;
- c) Alteração do sítio alvo do antibiótico assim o mesmo não se liga apropriadamente. Este tipo de mecanismo é usado por algumas cepas de *E. coli* resistentes a quinolonas e macrolídeos;
- d) Eliminação total do sítio alvo do antibiótico, através de uma produção exagerada da enzima alvo ou produzindo uma enzima alvo alternativa.

Na maioria dos casos de diarreia não é recomendado a antibioticoterapia. No caso de STEC é contra indicado o uso de antibióticos tendo em vista que a lise da bactéria libera muita toxina. Além disto, estudos recentes têm demonstrado que as cepas virulentas de *E. coli* como EPEC, ETEC, STEC, EIEC e EAEC são resistentes à maioria das drogas disponíveis e acessíveis em países em desenvolvimento, assim não existindo um tratamento ótimo (OKEKE, 2009).

2.7.3 Resistência antimicrobiana das espécies de *Enterococcus*

Enterococcus spp estão dentre os micro-organismos que sofreram grandes modificações na sensibilidade aos antimicrobianos com o correr dos anos (TAVARES, 2000).

A resistência intrínseca de muitos dos *Enterococcus* spp a agentes antimicrobianos comumente utilizados pode ter permitido uma vantagem de efeito cumulativo para a aquisição de mais genes codificadores de alto nível de resistência

aos aminoglicosídeos, penicilinas, tetraciclina e cloranfenicol, e agora vancomicina. São conhecidos pelo menos três razões para a emergência de *Enterococcus* spp multidroga-resistentes (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000):

1. Resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos;
2. Resistência adquirida através da mobilidade de genes de resistência sobre plasmídios e transposons, e troca cromossômica;
3. Transferibilidade da resistência.

Além disso, é importante observar que essas transferências genéticas ocorrem frequentemente no trato gastrointestinal de humanos e animais, muitos dos quais têm outras bactérias sob potencial pressão seletiva de níveis terapêuticos ou subterapêuticos de antibióticos em exposição. Finalmente, o impacto ambiental de utilização dos antimicrobianos, a pressão da colonização e transmissão nosocomial de *Enterococcus* spp vancomicina resistentes é elevada em muitos hospitais e também pode ser elevado na indústria de animais saudáveis onde os organismos parecem sobreviver saudavelmente (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000; TAVARES, 2000).

A dupla regra que esta bactéria joga levantou interesses sobre os riscos para a propagação de cepas potencialmente virulentas e seus traços de resistência aos antibióticos fora de ambientes hospitalares, especialmente nos alimentos (FRANZ *et al.*, 2003). Consequentemente, é de grande importância desenvolver métodos que permitam uma diferenciação entre cepas com um potencial elevado da virulência e presumivelmente inofensivo ou mesmo as cepas benéficas encontradas nos alimentos e em outros ambientes naturais.

2.7.3.1 Resistência antimicrobiana em *E. faecium*

Do ponto de vista de resistência antimicrobiana de *E. faecium*, há uma associação entre resistência à ampicilina e vancomicina. Isolados de *E. faecium* ampicilina-resistentes são mais frequentemente detectados antes que a resistência à vancomicina seja encontrada. A ligação genética em *E. faecium* entre ampicilina, proteínas de ligação à penicilina 5 (PBP-5) e vancomicina, associada aos estudos

clínicos que demonstram o uso anterior de β -lactâmicos como fatores predisponentes principais, sugerem que os agentes antimicrobianos como as cefalosporinas, contribuem para o surgimento de *E. faecium* resistentes à vancomicina. A ligação entre β -lactâmicos resistentes, resistência à proteína de ligação à penicilina e vancomicina não parecem ter ocorrido ainda em *E. faecalis*, o que pode explicar para a detecção esporádica de *E. faecalis* resistente à vancomicina. (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000).

β -lactâmicos e glicopeptídeos são frequentemente as únicas opções para o tratamento de infecções severas por bactérias Gram-positivas. Resistência adquirida a estes antibióticos podem resultar principalmente de dois mecanismos independentes envolvendo produção de PBP de baixa afinidade e incorporação de D-Lac ou D-Ser ao invés de D-Ala à posição C-terminal do peptidoglicano precursor. Nenhum dos dois mecanismos confere isoladamente resistência cruzada e efeito sinérgico em certas cepas de *E. faecium* em que a produção induzível de precursores terminando em D-Lac aumenta suscetibilidade a β -lactâmicos, provavelmente porque a substituição de D-Ala por D-Lac prejudica a ligação cruzada de peptidoglicanos pela baixa afinidade PBP-5 (CREMNITER *et al.*, 2006).

2.7.3.2 *Enterococcus* spp vancomicina resistentes (VRE)

Salhstrom *et al.* (2009) investigaram a ocorrência de VRE no lodo de esgoto tratado, em uma planta sueca de tratamento de esgoto e, concluíram que o risco de resistência antimicrobiana está sendo espalhado às novas explorações agrícolas e à sociedade através do ambiente caso o lodo de esgoto seja usado na terra arável. Vancomicina geralmente é a última opção no tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas resistentes a múltiplos antibióticos como *Enterococcus* spp multirresistentes e estafilococos meticilina-resistentes.

Segundo Mundy, Sahn e Gilmore (2000), os fatores que tem contribuído para o crescimento da endemidade e infecções hospitalares por VRE são, a disseminação clonal de certas linhagens de *Enterococcus* spp, aumento da carga ambiental de *Enterococcus* spp secundários aos regimes antimicrobianos e limitações nas medidas de controle efetivo da infecção.

Vários autores têm reportado casos de *Enterococcus* spp vancomicina resistentes. Dalla Costa *et al.* (1998) relataram o primeiro caso de *Enterococcus* spp vancomicina resistente no Brasil. O isolado também se apresentou resistente à ampicilina, teicoplanina, gentamicina alta resistência e estreptomicina de alta resistência. Ribas *et al.* (2007) relataram o primeiro caso de *E. faecalis* vancomicina resistente no estado de Minas Gerais, Brasil. O isolado apresentou fenótipo vanA e genótipo *vanA*. Vilela *et al.* (2006) relataram o primeiro caso de *E. faecalis* vancomicina resistente no nordeste do Brasil.

Mundy, Sahm e Gilmore (2000) descrevem quatro razões para se alarmar com o isolamento de VRE:

- a) A aquisição de enterococos resistentes à vancomicina deixa poucas opções para o manejo da doença;
- b) Experimentos de conjugação confirmaram transferência de genes de resistência à vancomicina de *Enterococcus* spp para *Staphylococcus aureus*;
- c) Estudos epidemiológicos nos Estados Unidos e Europa identificaram diferentes pressões de seleção para proliferação de VRE, mas a expansão semelhante e rápida de populações resistentes;
- d) O sucesso limitado na última década da prevenção e controle de estratégias para conter a resistência à vancomicina (assim como a resistência à meticilina em estafilococos) destacam a dificuldade em limitar o problema, uma vez que seja estabelecida.

Notavelmente, colonização entérica de VRE usualmente antecede à infecção (WELLS *et al.*, 1994).

Estudos realizados por Palazzo *et al.* (2006) relatam a integridade do transposon *Tn1546* em *Enterococcus* spp que circulam no Brasil e a resistência mediada por plasmídios aos glicopeptídeos facilitam a sua propagação horizontal entre as cepas de *Enterococcus* spp. Outra possibilidade também considerada pelos autores é a disseminação da resistência aos micro-organismos considerados universalmente susceptíveis.

Werner *et al.* (2011) observaram a transferência intra e inter-espécies em bactérias intestinais Gram-positivas para explicar a prevalência de plasmídios

contendo *vanA* entre *E. faecium* e concluíram que a transferência intra-espécies é muito mais frequente do que inter-espécies.

Enterococcus spp glicopeptídeos resistentes com gene *vanA* tem persistido em fazendas de frangos de corte no Reino Unido, apesar da ausência da pressão seletiva do antimicrobiano à avoparcina. Garcia-Migura, Liebana e Jensen (2007) concluíram que a transferência horizontal de resistência à vancomicina pode desempenhar um papel mais importante na persistência da resistência antimicrobiana do que propagação clonal.

2.7.3.3 *Enterococcus* spp resistentes a aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são antimicrobianos clinicamente relevantes, frequentemente prescritos na prática, uma vez que possui boa farmacocinética e mostra sinergismo com β -lactâmicos e glicopeptídeos. Um dos maiores mecanismos envolvidos na resistência de aminoglicosídeos é a inativação do agente antibiótico por enzimas aminoglicoside-modificadoras (AGMEs) (FILIPOVÁ; BUJDÁKOVÁ, 2005).

É necessário a sociedade refletir sobre a importância, na disseminação de germes resistentes, do mal uso de antimicrobianos pelo médico, pelo dentista e pelo veterinário; da criminosa disponibilidade e venda destas substâncias sem qualquer tipo de controle; da autorização para a comercialização de produtos contendo substâncias antimicrobianas sem o rígido controle de qualidade; da insana aprovação para a engorda de animais de antimicrobianos usados na terapêutica ou a eles relacionados; da propaganda que tem por objetivo o lucro, sem a preocupação com aspectos éticos. É necessário discutir se a disseminação de microrganismos resistentes causando doenças no homem é o resultado da ignorância, da má administração, da má fé, da ganância. É dever da humanidade não permitir que as substâncias antimicrobianas colocadas à disposição do homem continuem desbaratadas e perdendo sua eficácia. (TAVARES, 2000, p. 292).

2.7.3.4 Principais mecanismos de resistência de *Enterococcus* spp

Um resumo dos principais mecanismos de resistência às diversas classes de antimicrobianos em *Enterococcus* spp está apresentado no Quadro 2.

Classe de antimicrobianos	Mecanismo de resistência / gene
β-lactâmicos	PBP-5 baixa afinidade (especialmente em <i>E. faecium</i>); β-lactamase (penicilinase; raro)
Glicopeptídeos	D-alanyl-D-lactate contendo peptidoglicanos precursores, <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanD</i> D-alanyl-D-serine contendo peptidoglicanos precursores, <i>vanC</i> , <i>vanE</i> and <i>vanG</i>
Aminoglicosídeos	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: Resistência à gentamicina, <i>aac(6')-aph(2'')</i> , <i>aph(2'')-Ib</i> , <i>aph(2'')-Ic</i> , <i>aph(2'')-Id</i> ; Resistência à estreptomicina, <i>ant(6)-I</i> , <i>ant(3'')-I</i> ; Resistência à tobramicina/canamicina/amicacina, <i>ant(4')-I</i> ; Resistência à canamicina/amicacina, <i>aph(3')-III</i> ; Resistência à espectinomicina, <i>ant(9)-I</i>
Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas B e cetolides	23S Rrna methylase, <i>erm(B)</i> , <i>erm(other)</i> (MLS _B phenotype); Bomba de efluxo, <i>mef(?)</i> , <i>msrCOM</i> ; lincosamida nucleotidiltransferase, <i>lnu(B)</i>
Combinações da estreptogramina	estreptogramina A acetiltransferase, <i>vat(D)</i> , <i>vat(E)</i> ; estreptogramina B liase, <i>vgb(A)</i> (raro)
Fluoroquinolona	Mutações em topoisomerase IV (<i>parC</i> , <i>parE</i>) e DNA gyrase (<i>gyrA</i> , <i>gyrB</i>); Bomba de efluxo, <i>emeA</i> , outro
Oxazolidinonas	G2576T 23S Rdna mutação (raro)
Cloranfenicol	Cloranfenicol acetiltransferase, <i>cat</i>
Rifampicina	Mutações Cromossomais, <i>rpoB</i>
Tetraciclínas	Proteção Ribossomal, <i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(S)</i> ; Bomba de efluxo, <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> ; Mecanismo desconhecido, <i>tet(U)</i>
Trimetoprim	Mutações Cromossomais, <i>dfr</i> ; DHFR adquirida, <i>dfrF</i>

QUADRO 2 – MECANISMO DE RESISTÊNCIA EM *Enterococcus* spp

FONTE: WOODFORD (2005)

LEGENDA: PBP – penicillin-binding protein; DHFR – dihydrofolate reductase

As coletas foram realizadas nos municípios de Curitiba, Pinhais, São José dos Pinhais, Contenda, Lapa, Mandirituba, Araucária, conforme ilustrado na Figura 4.

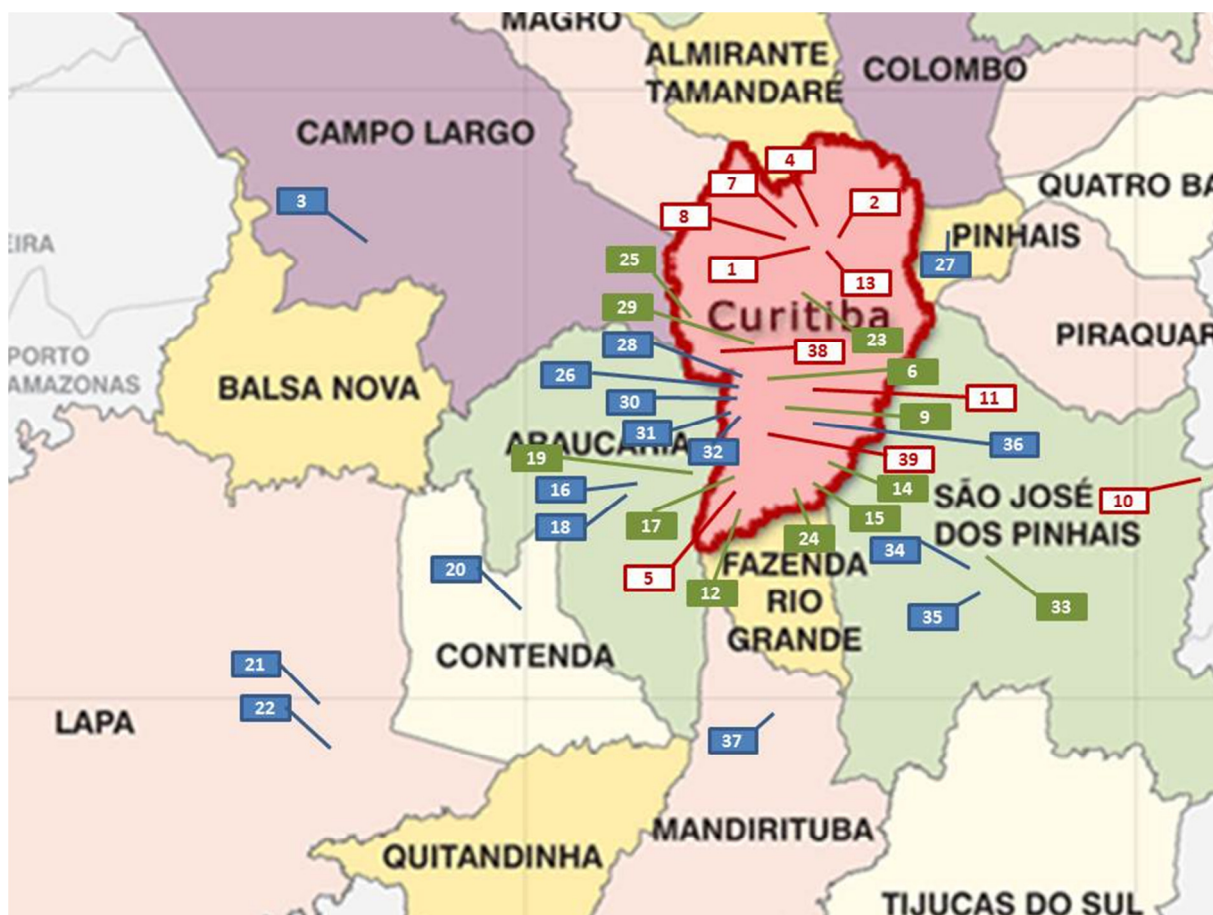


FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

LEGENDA: caixas vermelhas: fonte; caixas azuis: poço; caixas verdes: mina

A seleção dos pontos de coleta em fontes de parques e bosques públicos foi realizada através de dados disponíveis no Portal da Prefeitura Municipal de Curitiba e, nos poços e minas da RMC por indicações de colaboradores deste trabalho.

3.2 COLETA, TRANSPORTE E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Entre dezembro de 2009 a maio de 2010 foram coletadas 39 amostras de água de fontes alternativas da RMC sendo 11 amostras de fontes disponíveis em parques ou bosques, 12 de minas e 16 de poços, em frasco estéril com capacidade

de 1000 mL, contendo 450 mg de EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) como agente quelante de possíveis metais pesados. As amostras foram transportadas acondicionadas sob refrigeração para o laboratório de microbiologia.

Antes da abertura dos frascos, as amostras foram homogeneizadas e a área externa das mesmas limpas com álcool 70% para remoção dos contaminantes presentes.

As amostras foram identificadas em ordem numérica do 1 ao 39 e a caracterização dos pontos de coleta das amostras está descrita na Tabela 5.

TABELA 5 – CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DAS AMOSTRAS

continua			
Ponto	Tipo de Fonte	Município	Data da coleta
1	Fonte	Curitiba	7/12/2009
2	Fonte	Curitiba	6/12/2009
3	Poço	Campo Largo	7/12/2009
4	Fonte	Curitiba	9/12/2009
5	Fonte	Curitiba	9/5/2010
6	Mina	Curitiba	29/1/2010
7	Fonte	Curitiba	30/1/2010
8	Fonte	Curitiba	6/2/2010
9	Mina	Curitiba	6/2/2010
10	Fonte	São José dos Pinhais	6/2/2010
11	Fonte	Curitiba	21/2/2010
12	Mina	Curitiba	21/2/2010
13	Fonte	Curitiba	28/2/2010
14	Mina	Curitiba	28/2/2010
15	Mina	Curitiba	28/2/2010
16	Poço	Araucária	7/3/2010
17	Mina	Curitiba	7/3/2010
18	Poço	Araucária	7/3/2010
19	Mina	Araucária	7/3/2010
20	Poço	Contenda	8/3/2010
21	Poço	Lapa	8/3/2010
22	Poço	Lapa	8/3/2010
23	Mina	Curitiba	14/3/2010
24	Mina	Curitiba	14/3/2010
25	Mina	Curitiba	22/3/2010
26	Poço	Curitiba	28/3/2010
27	Poço	Pinhais	28/3/2010

Ponto	Tipo de Fonte	Município	conclusão
			Data da coleta
28	Poço	Curitiba	28/3/2010
29	Mina	Curitiba	28/3/2010
30	Poço	Curitiba	28/3/2010
31	Poço	Curitiba	28/3/210
32	Poço	Curitiba	28/3/2010
33	Mina	São José dos Pinhais	11/4/2010
34	Poço	São José dos Pinhais	11/4/2010
35	Poço	São José dos Pinhais	11/4/2010
36	Poço	Curitiba	19/4/2010
37	Poço	Mandirituba	18/4/2010
38	Fonte	Curitiba	3/5/2010
39	Fonte	Curitiba	9/5/2010

3.3 MEIOS DE CULTURA, SOLUÇÕES, REAGENTES E INSUMOS

Os meios de cultura e reagentes utilizados nas etapas de isolamento, identificação, caracterização fenotípica e genotípica e, no teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão estão descritos a seguir.

3.3.1 Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli*

- Tubos com 10 mL de caldo lauril sulfato triptose (LST), concentração dupla, com tubos de Durham (Laborclin);
- Tubos com 10 mL de caldo lauril sulfato triptose (LST), concentração simples, com tubos de Durham (Laborclin);
- Tubos com 10 mL de caldo verde brilhante bile 2% (VB), com tubos de Durham (Laborclin);
- Tubos com 10 mL de caldo *E. coli* (EC), com tubos de Durham (Laborclin);
- Substrato cromogênico e fluorogênico Aquateste coli® para 100 mL de amostra, desidratado (Laborclin);

- Placas de Petri, tamanho 90x15, com 20 mL de ágar MacConkey (Laborclin);
- Placas de Petri, tamanho 90x15, com 20 mL de ágar tripticase de soja (TSA) (Laborclin);
- Sistema de identificação bioquímica de bacilos Gram-negativos, oxidase-negativos, Bactray n° 1 e n° 2. O conjunto de provas bioquímicas Bactray 1 é composto pelas provas de hidrólise do substrato ONPG, dehidrogenação da arginina (ADH), descarboxilação da lisina (LDC), descarboxilação da ornitina (ODC), produção de gás sulfídrico (H₂S), prova urease (URE), prova de Voges Proskauer (VP), prova da fenilalanina (PD), reação de indol (IND) e consumo de citrato como única fonte de carbono (CIT). O conjunto de provas bioquímicas Bactray 2 é composto pelas provas de consumo de malonato como única fonte de carbono (MAL), e provas de fermentação de açúcares, ramnose (RAM), adonitol (ADO), salicina (SAL), arabinose (ARA), inositol (INO), sorbitol (SOR), sacarose (SAC), manitol (MAN) e rafinose (RAF) (Laborclin);
- Tira para reação de oxidase, impregnadas com reagente N,N, difenilamina (Laborclin);
- Óleo mineral estéril (Laborclin);
- Reagente de Kovacs para teste de indol (Laborclin);
- Reagentes para prova de Voges Proskauer (VP), solução de hidróxido de potássio a 40% e solução de alfa naftol a 5% (Laborclin);
- Solução de Cloreto férrico a 10% (Laborclin);
- Programa informatizado Bactray, para interpretação dos resultados do sistema Bactray (Laborclin);
- Soros para tipagem de *E. coli* clássica polivalente A, B e C (Probac);
- Soros para tipagem de *E. coli* enteroinvasora polivalente A e B (Probac);
- Soros para tipagem de *E. coli* enterohemorrágica O157 (Probac).

3.3.2 *Enterococcus* spp

- Placas de Petri, tamanho 60x15, com 10 mL de ágar m-Enterococos (Laborclin);

- Placas de Petri, tamanho 60x15, com 10 mL de ágar m-El, meio de cultura cromogênico membrane-enterococcus Indoxyl- β -D-glucoside Agar, método nº 1600, descrito no *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) (Laborclin);
- Tubos com 3 mL de ágar bile esculina, inclinado (Laborclin);
- Tubos com 3 mL de caldo meio de tolerância ao sal (MTS) com 6,5% de cloreto de sódio (Laborclin);
- Tubos com 4 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Laborclin);
- Solução de peróxido de hidrogênio a 3% (Laborclin);
- Sistema de identificação bioquímica para prova de carboidratos: Bactray nº 2 (Laborclin);
- Meio para prova de gelatinase, placas de Petri, tamanho 90x15, contendo ágar Todd-Hewitt (Todd-Hewitt caldo acrescido de 15g/litro de ágar) acrescido de 30g de gelatina por litro (Laborclin);
- Meio para prova de caseinase, placas de Petri, tamanho 90x15, contendo ágar Mueller Hinton (MHA), acrescido de 3% (p/v) de leite desnatado (Laborclin);
- Meio para prova de hemolisina, placas de Petri, tamanho 90x15, contendo ágar tripticase de soja (TSA) suplementado com 5% de sangue de cavalo (Laborclin);
- Reagente para teste do PYR, disco de papel de filtro impregnado com L-pirrolidonil- β -naftillamida e reagente contendo 0.015% de p-dimetilaminocinamaldeído (Probac);
- Discos para o teste de β -lactamase, discos de papel de filtro impregnados com nitrocefina, uma cefalosporina cromogênica, para detectar a presença da enzima β -lactamase (Becton Dickinson).

3.3.3 Teste de disco-difusão

- Placas de Petri, tamanho 140x15, com 70 mL de ágar Mueller Hinton (MHA) (Laborclin);
- Escala tubo 0,5 de McFarland, suspensão contendo cloreto de bário e ácido sulfúrico para padronização da suspensão bacteriana (Laborclin);

- Multidisco para Gram-negativo, composto por 12 discos impregnados com ceftazidima (CFO 30µg), gentamicina (GEN 10µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC 20/10 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cefuroxima (CRX 30 µg), cefalotina (CFL 30 µg), sulfazotrim (SUT 25 µg), ampicilina (AMP 10 µg), meropenem (MER 10 µg), amikacina (AMI 30 µg), ceftazidima (CAZ 30 µg) e cefepime (CPM 30 µg). (Laborclin);
- Multidisco para Gram-positivo, composto por 12 discos impregnados com ciprofloxacina (CIP 5µg), cloranfenicol (CLO 30µg), eritromicina (ERI 15µg), penicilina (PEN 10U), rifampicina (RIF 5µg), tetraciclina (TET 30µg), vancomicina (VAN 30µg), além de cefepime (CPM 30µg), clindamicina (CLI 2µg), gentamicina (GEN 10µg), oxacilina (OXA 1µg) e sulfazotrim (SUT 25µg) (Laborclin);
- Discos de gentamicina de alta resistência (GEN 120µg) (Laborclin);
- Discos de estreptomicina de alta resistência (EST 300µg) (Cefar);
- Discos de ampicilina (AMP 10µg) (Laborclin).

3.3.4 Outros

- Reagente orto-tolidina (Laborclin);
- Placas de Petri, tamanho 90x15, com 15 mL de ágar cromogênico Cromoclin US®, ágar nutriente contendo substratos cromogênicos (Laborclin);
- Conjunto de corantes e reagentes para coloração de Gram, contendo corante fucsina e violeta de genciana, solução descorante e lugol fraco (Laborclin);
- Membrana filtrante, porosidade 0,45µ, 47 mm de diâmetro, estéril (Millipore);
- Oligos iniciadores (Erviegas).

3.4 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

O trabalho foi realizado seguindo-se o fluxograma ilustrado na Figura 5.

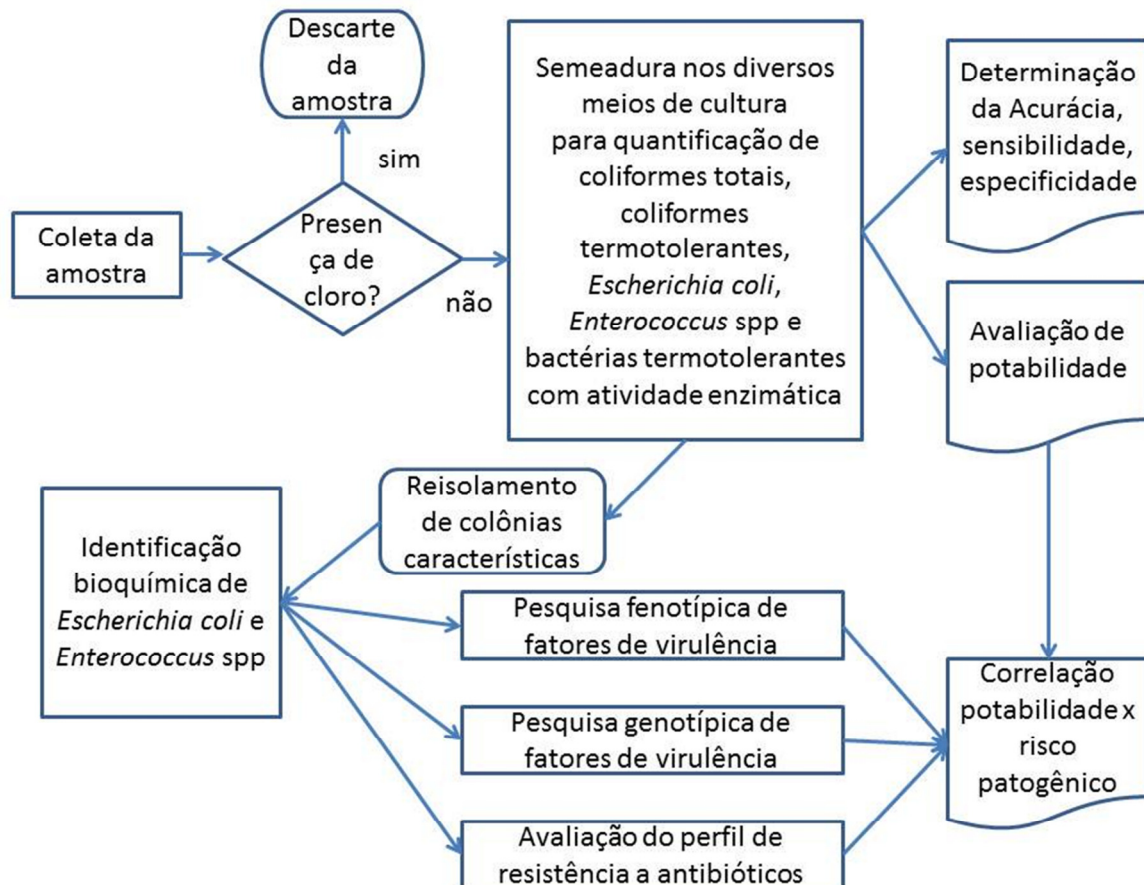


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO

3.5 PESQUISA DE CLORO LIVRE

Foi adicionado 5 mL da amostra em tubo de ensaio e acrescentadas 5 gotas do reagente orto-tolidina. A coloração amarela é indicativa da presença de cloro livre (EATON et al., 2005). Após a desinfecção, a água deve conter um teor mínimo de cloro residual livre de 0,5 mg/L, sendo obrigatória a manutenção de, no mínimo, 0,2 mg/L em qualquer ponto da rede de distribuição (BRASIL, 2004).

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS PELO MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLOS E DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO

As análises para quantificação de coliformes totais foram realizadas de acordo com a técnica dos tubos múltiplos, utilizando caldo lauril sulfato triptose e através do método do substrato cromogênico utilizando Aquatest coliformes® (Laborclin, Pinhais, Brasil). Ambas metodologias estão descritas no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, publicado pela APHA (EATON *et al.*, 2005).

3.6.1 Método dos Tubos múltiplos

A partir do frasco de coleta, transferiu-se cinco porções de 10 mL de água, cinco porções de 1 mL e 5 porções de 0,1 mL em tubos contendo o meio lauril sulfato triptose e tubos de Durham. Para porções de 10 mL usou-se meio de cultura concentrado ao dobro e para as porções de 1 mL e 0,1 mL usou-se meio de cultura com concentração simples. Após homogeneização, os tubos foram incubados por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os tubos com turvação e formação de gás, que ficou retido no tubo de Durham, foram contados. Para confirmar a presença de coliformes totais, foi repicado 0,1 mL em tubos contendo caldo verde brilhante e tubo de Durham e incubado por 48 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os tubos com turvação e formação de gás caracterizaram os coliformes totais.

O número de coliformes totais foi determinado enquadrando-se o número de tubos confirmados positivos na Tabela de Número Mais Provável, índice de confiança de 95%, para diversas combinações de tubos positivos em séries de 5. Os resultados foram expressos em log (10). As colônias foram isoladas estriando-se por esgotamento uma alçada do caldo verde brilhante em ágar MacConkey e incubando a placa por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram selecionadas as colônias vermelhas (fermentadoras de lactose) para análises posteriores.

3.6.2 Método do Substrato Cromogênico

O meio Aquateste coli® foi hidratado com 100 mL de amostra e aliquotou-se esta mistura em 15 tubos estéreis sendo 5 porções de 10 mL, 5 porções de 1 mL e 5 porções de 0,1 mL. Incubou-se por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. A leitura positiva para coliformes totais foi a formação da cor amarela. O número de coliformes totais foi determinado enquadrando-se o número de tubos confirmados positivos na Tabela de Número Mais Provável, índice de confiança de 95%, para diversas combinações de tubos positivos em 3 séries de 5 tubos. Os resultados foram expressos em log (10). A partir dos tubos positivos, isolaram-se as colônias estriando por esgotamento uma alçada do meio Aquateste coli® em ágar MacConkey e incubando a placa por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram selecionadas as colônias vermelhas (fermentadoras da lactose) para análises posteriores.

O meio Aquateste coli® caracteriza-se pela presença de substrato cromogênico ONPG que é hidrolisado na presença de coliformes totais, ficando amarelo pela liberação do para-nitrofenol. E o substrato fluorogênico MUG que é hidrolisado na presença de *E. coli*, apresentando fluorescência azulada quando exposta à luz UV, pela formação da umbeliferona (MANAFI; KNEIFEL; BASCOMB, 1991).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES PELO MÉTODO DE TUBOS MÚLTIPLOS

As análises para quantificação de coliformes termotolerantes foram realizadas de acordo com a técnica dos tubos múltiplos, utilizando caldo EC (*E. coli*). A metodologia está descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* publicado pela APHA (EATON *et al.*, 2005).

Para confirmar a presença de coliformes termotolerantes, 0,1 mL de cada tubo positivo no caldo lauril sulfato triptose foi transferido para tubos contendo caldo EC e tubo de Durham. Incubou-se por 24 horas a $44,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. Os tubos com turvação e formação de gás caracterizaram coliformes termotolerantes.

O número de coliformes termotolerantes foi determinado enquadrando-se o número de tubos positivos na Tabela de Número Mais Provável, índice de confiança de 95%, para diversas combinações de tubos positivos em 3 séries de 5 tubos. Os resultados foram expressos em log (10). Foram selecionados de 1 a 3 tubos positivos para isolamento de colônias de *E. coli*. As colônias foram isoladas estriando por esgotamento uma alçada do caldo EC em ágar MacConkey e incubando a placa por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram selecionadas as colônias vermelhas (fermentadoras da lactose) para análises posteriores.

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE *E. coli* PELO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO

A partir da leitura positiva para coliformes totais no substrato cromogênico, isto é tubos amarelos, realizou-se a leitura para *E. coli*. A leitura positiva para esta bactéria foi observada quando a fluorescência azul nos tubos expostos à luz UV estava presente. O número de *E. coli* foi determinado enquadrando-se o número de tubos positivos na Tabela de Número Mais Provável, índice de confiança de 95%, para diversas combinações de tubos positivos em 3 séries de 5 tubos. Os resultados foram expressos em log (10). Foram selecionados de 1 a 3 tubos positivos para isolamento de colônias para etapas seguintes, isolando-se as colônias estriando por esgotamento uma alçada do meio Aquateste coli® em ágar MacConkey e incubando a placa por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. As colônias lactose positivas (vermelhas) foram selecionadas para testes posteriores.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE *Enterococcus* spp PELO MÉTODO DE MEMBRANA FILTRANTE EM MEIO DE CULTURA CLÁSSICO E CROMOGÊNICO

As análises para quantificação de *Enterococcus* spp foram realizadas de acordo com a técnica da membrana filtrante, utilizando-se meio de cultura clássico, o ágar m-enterococcus, descrita no *Standard Methods for the Examination of Water*

and Wastewater publicado pela APHA (2005). E através da técnica da membrana filtrante utilizando-se o ágar m-EI.

O ágar m-enterococcus caracteriza-se pela presença de azida como agente inibidor de bactérias não alvo. A cor vermelha dá-se pela presença de TTC (cloreto de trifenil tetrazólio) que é reduzido para formar um complexo corado no interior da célula bacteriana.

O ágar m-EI caracteriza-se pela presença de azida como agente inibidor de bactérias não alvo e também de cicloheximida para inibição de fungos. A cor azul dá-se pela presença do substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glicoside, que é hidrolisado pela enzima β -D-glicosidase presente em *Enterococcus* spp, formando um complexo corado insolúvel azul índigo.

3.9.1 Método da membrana filtrante usando ágar m-enterococcus

Foi filtrada 100 mL da água em membrana filtrante. Em seguida a membrana foi transferida para a superfície do ágar m-Enterococos. Incubaram-se as placas por 48 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram contadas as colônias vermelhas e os resultados foram reportados em UFC/100 mL. Os resultados foram expressos em log (10). Foram selecionadas colônias a partir de 1 a 3 placas para análises posteriores.

3.9.2 Método da membrana filtrante usando substrato cromogênico

Foi filtrada 100 mL da água em membrana filtrante, e semeada a membrana na superfície do ágar m-EI. Incubou-se a placa por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram contadas as colônias azuis e os resultados foram reportados em UFC/100 mL. Os resultados foram expressos em log (10). Foram selecionadas colônias a partir de 1 a 3 placas para análises posteriores.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS TERMOTOLERANTES COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELO MÉTODO DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO

Foi filtrada 100 mL da água em membrana filtrante, e semeada a membrana em ágar Cromoclin US® (Laborclin, Pinhais, Brasil). A placa foi incubada por 24 horas a $45\pm0,5^{\circ}\text{C}$. A escolha dessa temperatura deu-se para selecionar o crescimento de coliformes termotolerantes, incluindo *E. coli* e *Enterococcus* spp que apresentam como característica o crescimento a 45°C .

Foram contadas as colônias azuis, que apresentaram atividade β -D-glicosidásica (β -D-GLIC) e/ou β -D-galactosidásica + β -D-glicosidásica (β -D-GAL+ β -D-GLIC) e, colônias magenta que apresentaram atividade β -D-glucuronidásica (β -D-GLU) e/ou β -D-galactosidásica (β -D-GAL). Os resultados foram reportados em UFC/100 mL. Os resultados foram expressos em log (10). Foram selecionadas colônias azuis e magenta, a partir de 1 a 3 placas para análises posteriores.

O ágar Cromoclin US® caracteriza-se pela presença de três substratos cromogênicos, o substrato magenta- β -D-glucuronide que na presença de *E. coli* libera um pigmento magenta, o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-glicoside que é hidrolisado pela enzima β -D-glicosidase presente em *Enterococcus* spp e coliformes e libera um pigmento azul índigo, e o substrato rosa- β -D-galactoside que é hidrolisado pela enzima β -D-galactosidase presente nos coliformes e *Staphylococcus saprophyticus*. O meio de cultura contém nutrientes que propiciam o crescimento de bactérias aeróbias e aeróbias facultativos.

3.11 DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ENTRE OS MÉTODOS EMPREGADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES E *Enterococcus* spp

Para a determinação da acurácia, sensibilidade e especificidade entre os métodos empregados foi avaliado o grau de concordância entre os métodos, utilizando-se as fórmulas descritas na Norma ISO 16140 para os cálculos. Os dados

foram tabulados conforme indicados no Quadro 3 e, calculados com as fórmulas descritas no Quadro 4. Para contar o número de amostras com concordância positiva (PA), contou-se o número de amostras que deram positivas nos dois métodos. Para concordância negativa (NA), contou-se o número de amostras que deram negativas nos dois métodos. O desvio positivo (PD) deu-se onde o método de referência apresentou-se negativo e o método alternativo apresentou resposta positiva. Para o desvio negativo (ND) o método de referência apresentou-se positivo e o método alternativo foi negativo (Quadro 3).

Resultados	Método de referência positivo (R+)	Método de referência negativo (R-)
Método alternativo positivo (A+)	+/+ concordância positiva (PA)	-/+ Desvio positivo (PD)
Método alternativo negativo (A-)	+/- Desvio negativo (ND)	-/- concordância negativa (NA)

QUADRO 3 - MODELO PARA TABULAÇÃO DOS RESULTADOS PARA CÁLCULO DE ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE
FONTE – ISO 16140 (2003)

Acurácia relativa (AC) é o grau de correspondência entre a resposta obtida pelo método de referência e a resposta obtida pelo método alternativo em amostras idênticas. Especificidade relativa (SP) é a habilidade do método alternativo de não detectar o analito quando não é detectado pelo método de referência. Sensibilidade relativa (SE) é a habilidade do método alternativo de detectar o analito quando é detectado pelo método de referência (ISO 16140, 2003).

Acurácia relativa (AC) = $(PA+NA) \times 100\% / N$

Especificidade relativa (SP) = $NA \times 100\% / N_{-}$

Sensibilidade relativa (SE) = $PA \times 100\% / N_{+}$

Onde,

N = número total de amostras ($NA + PA + PD + ND$);

N_{-} = número total de resultados negativos com o método de referência ($NA + PD$);

N_{+} = número total de resultados positivos com o método de referência ($PA + ND$).

QUADRO 4 - MODELO DE FÓRMULA PARA CÁLCULO DE ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

FONTE – ISO 16140 (2003)

Os resultados foram reportados como:

- a) Concordância do método de tubos múltiplos com o método do substrato enzimático para determinação de coliformes;
- b) Concordância do método de membrana filtrante utilizando o meio de cultura clássico e o substrato enzimático para determinação de *Enterococcus* spp.

3.12 AVALIAÇÃO DA POTABILIDADE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE FONTES ALTERNATIVAS

A potabilidade da água foi determinada baseada na legislação brasileira que descreve que em amostras individuais procedentes de poços, fontes, nascentes e outras formas de abastecimento sem distribuição canalizada, tolera-se a presença de coliformes totais, na ausência de *E. coli* e, ou, coliformes termotolerantes (BRASIL, 2004).

3.13 IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli* E *Enterococcus* spp ATRAVÉS DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS

3.13.1 Identificação bioquímica de *E. coli*

Os isolados da etapa de quantificação foram repicados em ágar MacConkey e colônias vermelhas foram submetidas à coloração de Gram para confirmação da morfologia (bacilos) e reação ao Gram (Gram-negativas). Foi realizado o teste de oxidase e quando negativo foi preparada suspensão bacteriana com aproximadamente 10^8 células/mL em água estéril (comparação visual da turvação com escala tubo 0,5 de McFarland). A suspensão foi semeada no conjunto de provas bioquímicas Bactray 1 e 2 (Laborclin, Pinhais, Brasil), incubado por 24 horas

a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a identificação foi efetuada conforme programa informatizado específico do kit.

O teste de oxidase foi efetuado em tiras. A reação positiva foi caracterizada pela formação de coloração azul e na reação negativa a cor da tira permaneceu inalterada.

O programa informatizado Bactray, versão 2.4, foi utilizado para a interpretação dos resultados, conforme modelos apresentados nas telas a seguir.

A Figura 6a mostra um exemplo de leitura no sistema Bactray 1 e a Figura 6b, um exemplo de leitura no sistema Bactray 2.



FIGURA 6 – MODELO DE TELAS PARA CÁLCULO DO CÓDIGO DE BACTRAY 1 (a) E 2 (b)

A Figura 7 exemplifica um relatório apresentado pelo sistema Bactray 1 e 2, onde permite que o resultado de cada prova bioquímica seja impresso com o percentual de probabilidade para a bactéria identificada, indicando também a proporção de isolados com o perfil obtido.

Sistema Bactray Versão 2.4 Emissão: 23/2/2011 21:16:13

Resultado das amostras Bactray I e II

Código da amostra: P11A5
Nome do cliente: BOSQUERINARD
Código: 5144463
Perfil Bactray I: ONPG+ ADH- LDC+ ODC+ H2S- URE- VP- PD- IND+ CIT-
Perfil Bactray II: MAL- RAM+ ADO- SAL- ARA+ INO- SOR+ SAC+ MAN+ RAF+

Microorganismo	Percentual	Proporção
ESCHERICHIA COLI 1	99,99%	1:1 Excelente
ESCHERICHIA COLI 2	0,01%	1:8.215

FIGURA 7 – MODELO DE RELATÓRIO DO RESULTADO DO BACTRAY

3.13.2 Identificação presuntiva de *Enterococcus* spp

As colônias isoladas na etapa de quantificação foram repicadas no ágar Cromoclin US® e, selecionando-se colônias azuis submeteu-se à coloração de Gram para confirmação da morfologia (cocos) e reação ao Gram (Gram-positivas). Foi realizado teste de catalase com solução de peróxido de hidrogênio a 10% e quando este foi negativo, isto é não havendo formação de borbulhamento, foi realizado teste de crescimento em ágar bile esculina, caracterizado pelo enegrecimento do meio de cultura após incubação de 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. A prova do crescimento a 45°C por 24 horas em caldo BHI interpretada com a turvação do meio de cultura, crescimento em presença de 6,5% de cloreto de sódio em caldo MTS interpretada pela viragem da coloração púrpura para o amarelo após 24 horas de incubação a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ e, teste de PYR caracterizado pela coloração avermelhada quando raspada a colônia isolada no disco em contato com o reagente do kit.

3.13.3 Identificação bioquímica de *Enterococcus* spp

Para diferenciação das espécies de *Enterococcus*, foi preparada uma suspensão com turvação comparada visualmente à escala tubo 0,5 de McFarland e esta foi semeada no conjunto de provas bioquímicas Bactray 2, incubado por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. A identificação foi efetuada considerando-se a fermentação dos carboidratos ramnose, adonitol, arabinose, sorbitol, sacarose e manitol (Quadro 5). A coloração amarela foi considerada reação positiva para a fermentação do carboidrato e a coloração azul ou verde foi considerada negativa.

	RHA	ADO	ARA	SOR	SAC	MAN
<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	POS	POS/NEG	POS/NEG	POS
<i>E. faecalis</i>	POS/NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS
<i>E. avium</i>	POS	POS	POS	POS	POS	POS
<i>E. casseliflavus</i>	POS/NEG	NEG	POS	POS/NEG	POS	POS
<i>E. gallinarum</i>	NEG	NEG	POS	NEG	POS	POS

QUADRO 5 - PROVAS PARA DIFERENCIAÇÃO DE *Enterococcus* spp ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS

LEGENDA: RHA - ramnose; ADO - adonitol; ARA - arabinose; SOR - sorbitol; SAC - sacarose; MAN - manitol; POS == reação positiva; NEG - reação negativa; POS/NEG - a reação pode ser tanto positiva quanto negativa

FONTE: HOLT *et al.* (2000)

3.14 PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE *E. coli* E *Enterococcus* spp, ATRAVÉS DE MÉTODOS FENOTÍPICOS

3.14.1 Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de *E. coli*

Os isolados de *E. coli* foram avaliados através de soroaglutinação utilizando-se soro polivalente A, B e C para identificar sorogrupos de *E. coli* clássicos associados à diarreia infantil (EPEC), soro polivalente A e B para identificar sorogrupos de *E. coli* enteroinvasora (EIEC), e também com soro anti *E. coli* O157 para identificar *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Uma suspensão densa foi preparada com colônia de 24 horas de crescimento em ágar TSA (*tryptic soy agar*) em salina estéril e meia gota foi colocada em lâmina de vidro e adicionada a uma gota do soro. Foram consideradas positivas as reações de aglutinação que ocorreram dentro de 2 minutos.

3.14.2 Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de *Enterococcus* spp

Os isolados de *Enterococcus* spp foram avaliados para a pesquisa da enzima β -lactamase, para a pesquisa de gelatinase, caseinase, e também para a produção de hemolisina.

3.14.2.1 Detecção da enzima β -lactamase em disco

Os isolados de *Enterococcus* spp foram avaliados com discos impregnados com nitrocefina, para detectar a presença da enzima β -lactamase. Um disco foi colocado em lâmina de vidro, umedecido com água estéril, e colônias de 24 horas de crescimento foram raspadas na superfície do disco. A viragem de cor para o vermelho caracterizou reação positiva.

3.14.2.2 Detecção da produção de gelatinase em ágar suplementado com gelatina

Uma alçada de 10 μ L do crescimento em caldo BHI de 24 horas a 37°C foi subcultivada no ágar suplementado com gelatina pela técnica de esgotamento, as placas foram incubadas por 18h a 37°C, e deixadas a 4°C por 5 horas antes de se observar zonas de opacidade ao redor das colônias, indicando hidrólise da gelatina (SU *et al.*, 1991). Esta prova foi caracterizada como prova de gelatinase.

3.14.2.3 Detecção da produção de gelatinase com ágar leite desnatado

Uma alçada de 10 μ L do crescimento em caldo BHI de 24 horas a 37°C foi subcultivada no ágar contendo leite desnatado pela técnica de esgotamento, a placa

foi incubada por 18h a 37°C. A formação de halo claro ao redor das colônias indicou proteólise. Esta prova foi caracterizada como prova de caseinase (ARCHIMBAUD *et al.*, 2002).

3.14.2.4 Detecção da produção de hemolisina

Uma alçada de 10 µL do crescimento em caldo BHI de 24 horas a 37°C foi subcultivada no ágar contendo sangue de cavalo pela técnica de esgotamento, a placa foi incubada por 18h a 37°C. Zonas claras ao redor das colônias indicaram produção de hemolisina (DOMIG; MAYER; KNEIFEL, 2003; EATON; GASSON, 2001; GOMES, 2007).

3.15 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE *E. coli* E *Enterococcus* spp, ATRAVÉS DE MÉTODOS GENOTÍPICOS

3.15.1 Preparo do DNA alvo

A extração do DNA foi realizada pelo método da fervura segundo Lench, Stainer e Williamson (1988). Os isolados de *Enterococcus* spp foram subcultivados em ágar TSA por 16 a 24 horas a 35°C. Uma suspensão bacteriana densa foi preparada em 500 µL de água ultrapura estéril em microtubos plásticos de 1,5 mL. Estes foram incubados em termobloco a 100°C por 15 minutos, para lise celular. Após 10 minutos a temperatura ambiente, o material foi centrifugado por 10 minutos microcentrífuga a 3000 rpm e o sobrenadante (que contém o DNA) foi transferido para outro tubo estéril e estocado a temperatura de 4°C até o momento do uso. Foi usada uma alíquota de 2 µL em cada reação de PCR.

3.15.2 Preparo da mistura de reação para PCR

As soluções de dNTPs, $MgCl_2$, tampão da Taq e mistura de iniciadores foram retirados do freezer a $-20^{\circ}C$, e após descongelamento foram mantidos em banho de gelo. Foram numerados os tubos de reação a serem testados, um controle positivo, um controle negativo e um tubo branco (que tem todos os reagentes exceto do DNA alvo). As reações foram realizadas em volume total da reação de PCR de 25 μL . Preparou-se a mistura de reação para as amostras em microtubos e os reagentes foram adicionados na seguinte ordem: 16,2 μL de água padrão PCR (Gibco); 2,2 μL de tampão da Taq DNA polimerase concentração 10x (Invitrogen); 1,3 μL de cloreto de magnésio 50 mM (Invitrogen); 0,6 μL de dATPs 10 mM (Invitrogen); 0,6 μL de dTTPs 10 mM (Invitrogen); 0,6 μL de dCTPs 10 mM (Invitrogen); 0,6 μL de dGTPs 10 mM (Invitrogen); 0,9 μL de Primer mix (5 mM) e 0,1 μL de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

Foi colocado 23 μL da mistura de reação em cada tubo numerado e 2 μL da amostra (DNA alvo armazenado a $4^{\circ}C$) foi adicionado à mistura. Os tubos foram fechados, homogeneizados em vórtex e pulsados em microcentrífuga. O termociclador foi ligado e os tubos foram colocados no termociclador (TC-412®, Techne). O programa com as condições de reação estabelecidas foi selecionado e iniciado. As condições utilizadas foram: desnaturação inicial a $94^{\circ}C$ por 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a $94^{\circ}C$ por 1 minuto, anelamento a $52^{\circ}C$ por 1 minuto e extensão a $72^{\circ}C$ por 1 minuto; extensão final a $72^{\circ}C$ por 5 minutos. Os produtos de PCR foram mantidos em temperatura de $4^{\circ}C$ até a realização da eletroforese.

3.15.3. Análise dos produtos

Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) em tampão TBE 0,5X (5,4 mg/mL de TRIS, 0,375 mg/mL de EDTA, 2,79 mg/mL de ÁCIDO BÓRICO, pH 8,0 a 8,5). Em todas as corridas foi incluído um marcador de peso molecular no primeiro poço (100bp ladder – Invitrogen). As amostras foram aplicadas após misturar 8 μL do produto de reação com 2 μL da

solução tampão de finalização da PCR (50 Mm EDTA Ph 8,0; 25% ficoll; 0,25% azul de bromofenol). As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando fonte de eletroforese horizontal a 110V durante 60 minutos. Os géis de agarose foram corados em solução de brometo de etídeo (1 µg/mL) por 60 minutos, visualizados em transluminador ultravioleta e as imagens registradas com câmera digital (Vilber loulmart).

3.15.4 Detecção dos genes de virulência dos isolados de *E. coli*

A pesquisa dos genes de virulência de *E. coli* diarreioogênicas foi efetuada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), usando os iniciadores específicos descritos no Quadro 6. Os genes pesquisados foram *aggR* para *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *stla/stlb/lt/st* para *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *eaeA* para *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora de toxina Shiga, *stx1/stx2* para STEC, *ipaH* para *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e, *daaD* para *E. coli* de aderência difusa (DAEC).

O protocolo utilizado no preparo do DNA alvo, no preparo da mistura de reação e na análise dos resultados foram os mesmos descritos nos itens 3.13.1, 3.13.2 e 3.13.3.

Todas as amostras negativas foram submetidas a uma reação de PCR para o gene 16S, usado como controle interno.

continua

Gene	Orien- tação	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>eaeA</i>	F R	ATG CTT AGT GCT GGT TTA GG GCC TTC ATC ATT TCG CTT TC	248	WANG; CLARK; RODGERS (2002)
<i>aggR</i>	F R	CGA AAA AGA GAT TAT AAA AAT TAA C GCT TCC TTC TTT TGT GTA T	100	GUION <i>et al.</i> (2008)
<i>daaD</i>	F R	TGA ACG GGA GTA TAA GGA AGA TG GTC CGC CAT CAC ATC AAA A	444	GUION <i>et al.</i> (2008)
<i>stla</i>	F	TTT CCC CTC TTT TAG TCA GTC AA	159	GUION <i>et al.</i> (2008)
<i>stlb</i>	F	TGC TAA ACC AGT AGA GTC TTC AAA A	138	GUION <i>et al.</i> (2008)
<i>st</i>	R	GCA GGA TTA CAA CAC AAT TCA CAG CAG		GUION <i>et al.</i> (2008)

				conclusão
<i>stx₁</i>	F R	CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	150	LOPEZ-SAUCEDO <i>et al.</i> (2003)
<i>stx₂</i>	F R	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	255	LOPEZ-SAUCEDO <i>et al.</i> (2003)
<i>ipaH</i>	F R	GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC	619	SETHABUTR <i>et al.</i> (1993)
<i>lt</i>	F R	TCT CTA TGT GCA TAC GGA GC CCA TAC TGA TTG CCG CAA T	322	TOMA <i>et al.</i> (2003)

QUADRO 6 - INICIADORES PARA PROVA DE PCR MULTIPLEX PARA GENES DE *E. coli* DIARREIOGÊNICAS

LEGENDA: F - Forward; R - Reverse

3.15.5 Detecção dos genes de virulência dos isolados de *Enterococcus* spp

O gene de virulência escolhido para a pesquisa foi a adesina do colágeno em *E. faecalis* (*ace*), pois a adesão à célula infectada é o primeiro passo para que a infecção ocorra. A pesquisa foi efetuada através de PCR usando os iniciadores específicos descritos no Quadro 7. O protocolo utilizado no preparo do DNA alvo, no preparo da mistura de reação e na análise dos resultados está descrito nos itens 3.13.1, 3.13.2 e 3.13.3.

Todas as amostras negativas foram submetidas a uma reação de PCR para o gene 16S, usado como controle interno.

Gene	Iniciador	Sequência do iniciador (5'→ 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>ace</i>	ACE 1 ACE 2	AAA GTA GAA TTA GAT CCA CAC TCT ATC ACA TTC GGT TGC G	320	MANNU <i>et al.</i> (2003)

QUADRO 7 - SEQUÊNCIA DO INICIADOR UTILIZADO NA PESQUISA DO GENE DE VIRULÊNCIA DE *E. faecalis* – *ace*

3.16 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS APRESENTADOS PELOS ISOLADOS DE *E. coli* E *Enterococcus* spp ATRAVÉS DO MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO (KIRBY-BAUER)

3.16.1 Determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de *E. coli*

A partir do crescimento em ágar MacConkey utilizado para a etapa da identificação bioquímica, foi preparada suspensão bacteriana com aproximadamente 10^8 células/mL em água estéril (turvação comparada visualmente com escala tubo 0,5 de McFarland), a qual foi semeada com auxílio de swab estéril em placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton. Foi acrescentado multidisco de antibióticos para Gram-negativo, com 12 antibióticos. Os resultados de sensibilidade foram comparados com a tabela CLSI, 2010.

3.16.2 Determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de *Enterococcus* spp

A partir do crescimento em ágar Cromoclin US® utilizada para a etapa da identificação bioquímica, foi preparada suspensão bacteriana com aproximadamente 10^8 células/mL em água estéril (turvação comparada visualmente com escala tubo 0,5 de McFarland) e semeada com auxílio de swab estéril em placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton. Foi acrescentado multidisco de antibióticos para Gram-positivo, com 12 antibióticos. Os resultados para cefepime, clindamicina, gentamicina 10µg, oxacilina e sulfazotrim foram desconsiderados para os *Enterococcus* spp. Foram incluídos os discos de gentamicina (GEN 120µg) e estreptomicina (EST 300µg) de alta resistência e ampicilina (AMP 10µg). A placa foi incubada por 24 horas a $35\pm 2^\circ\text{C}$ e o halo medido em mm para avaliar sensibilidade ou resistência do isolado. Os resultados de sensibilidade foram comparados com a tabela CLSI, 2010.

3.17 CORRELAÇÃO DOS ISOLADOS DE *E. coli* E *Enterococcus* spp COM A POTABILIDADE DA ÁGUA E O RISCO POTENCIAL PATOGÊNICO DE CONSUMO POR SERES HUMANOS

Para correlacionar os isolados de *E. coli* e *Enterococcus* spp com a potabilidade da água e o potencial risco patogênico de consumo por seres humanos foi elaborada uma tabela onde está demonstrada a potabilidade das amostras de água de fontes alternativas, baseado em parâmetros legais vigentes e a incidência de isolados contendo fatores de virulência, genes de virulência, perfil de resistência aos antibióticos e outros indicadores bacterianos.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados de quantificação dos indicadores foram submetidos à análise de variância fatorial (anova), seguido de teste de Tukey para classificação das médias. Os dados foram analisados em uma planilha do Microsoft Excel e pelo pacote de estatística Statistica 8.0 (StatSoft). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram analisados em razão dos objetivos propostos partindo-se da avaliação de cloro para evidenciar que se tratava de amostras não desinfetadas e, quando apresentavam resultados negativos para cloro residual, estas foram avaliadas microbiologicamente. Realizou-se a quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Enterococcus* spp. Dentre os isolados foram realizadas a pesquisa de fatores de virulência fenotípica e genotípica e a atividade antimicrobiana. Como para a quantificação de coliformes totais e *Enterococcus* spp foram utilizados dois métodos, avaliou-se a acurácia, sensibilidade e especificidade destes. Os resultados estão apresentados a seguir em itens específicos.

4.1 PESQUISA DE CLORO LIVRE

Todas as 39 amostras coletadas estavam sem cloro livre não formando coloração amarela com a adição de orto-tolidina, e assim, conforme definido no fluxograma de trabalho, Figura 5, todas as amostras coletadas foram semeadas em meios de cultura.

De acordo com a Portaria MS nº 518/2004, as águas para consumo humano devem conter no mínimo 0,2 mg/L de cloro livre. Assim sendo as amostras de água não se apresentaram próprias para consumo humano.

O uso de água não clorada ou cloração inadequada tem sido associado a surtos. A proporção de surtos associados ao consumo de água de poços no período de 1997-1998 a 1999-2000 nos Estados Unidos aumentou em 87%, onde 60,7% surtos foram associados ao uso de água não tratada. (LEE *et al.*, 2002).

4.2 DETERMINAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE *E. coli* E *Enterococcus* spp NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE FONTES ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA

Os resultados da etapa de quantificação de *E. coli* e *Enterococcus* spp, além da quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e bactérias com atividade enzimática estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES, *E. coli*, *Enterococcus* spp, E BACTÉRIAS COM ATIVIDADE ENZIMÁTICA NAS AMOSTRAS DE ÁGUA DE FONTES ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA

Continua

Tipo de fonte	Ponto	Log (10) UFC ou NMP / 100mL de amostra de água							
		Coliformes totais		Coliformes termotolerantes	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp		β -D-GLIC e/ou β -D-GAL+ β -D-GLIC	β -D-GLU e/ou β -D-GAL
		Meio LST	Meio Aquateste coli	Meio EC	Meio Aquateste coli	Meio m-enterococcus	Meio m-EI	meio Cromoclin US	meio Cromoclin US
Fonte	1	1,00	2,23	0,30	0,00	0,23	0,67	NR	NR
Fonte	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,15	NR	NR
Poço	3	0,91	1,11	0,30	0,00	0,00	0,15	NR	NR
Fonte	4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NR	NR
Fonte	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,70	2,40	0,20
Mina	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fonte	7	0,00	1,97	0,00	0,85	0,20	0,00	2,40	0
Fonte	8	3,30	3,30	2,73	3,20	2,40	2,40	2,40	2,40
Mina	9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,40	2,40
Fonte	10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,40	2,40
Fonte	11	3,30	3,30	3,30	3,20	2,40	2,40	2,40	2,40
Mina	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,40	0,00
Fonte	13	1,11	1,69	0,00	0,00	0,00	0,00	1,65	0,00
Mina	14	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,72	0,00
Mina	15	3,20	2,38	1,92	2,11	2,40	2,40	2,40	2,40
Poço	16	0,00	1,69	0,00	0,00	0,00	0,60	2,40	0,70
Mina	17	0,57	2,73	0,00	0,00	0,00	0,20	2,40	1,23
Poço	18	0,75	2,23	0,00	0,60	1,48	1,51	1,88	2,40
Mina	19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Poço	20	1,00	2,73	1,00	2,73	0,78	1,43	2,40	2,40
Poço	21	1,68	3,30	1,68	2,54	2,40	2,00	2,40	2,40

Conclusão

Tipo de fonte	Ponto	Log (10) UFC ou NMP / 100mL de amostra de água							
		Coliformes totais		Coliformes termotolerantes	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> spp		β -D-GLIC e/ou β -D-GAL+ β -D-GLIC	β -D-GLU e/ou β -D-GAL
		Meio LST	Meio Aquateste coli	Meio EC	Meio Aquateste coli	Meio m-enterococcus	Meio m-EI	meio Cromoclin US	meio Cromoclin US
Poço	22	0,00	1,67	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	2,40
Mina	23	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00
Mina	24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,48	0,00
Mina	25	3,30	3,30	3,30	3,30	2,40	2,40	2,40	2,40
Poço	26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Poço	27	0,57	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00
Poço	28	1,53	2,11	0,83	0,30	1,48	1,13	0,95	1,20
Mina	29	2,73	1,85	2,73	1,66	1,34	0,20	1,60	1,61
Poço	30	3,20	2,34	1,61	0,00	1,45	0,00	0,90	0,00
Poço	31	1,60	2,11	1,67	0,30	1,36	0,00	1,49	0,90
Poço	32	3,30	2,96	3,30	2,73	2,40	2,40	2,40	2,40
Mina	33	2,38	2,96	1,52	0,30	1,23	1,36	2,40	1,34
Poço	34	2,96	2,11	1,18	0,00	0,78	1,11	1,64	0,00
Poço	35	1,15	3,20	0,83	0,00	0,85	0,48	1,34	0,90
Poço	36	2,73	2,53	1,85	1,23	2,40	2,40	2,40	1,48
Poço	37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,76	0,00
Fonte	38	2,96	3,30	1,04	0,65	0,48	0,30	1,18	0,78
Fonte	39	3,30	3,30	3,30	3,30	2,40	2,40	2,40	2,40

LEGENDA: UFC – Unidades Formadoras de Colônias; NMP – Número Mais Provável; β -D-GLIC – bactérias com atividade β -D-glicosidásica; β -D-GAL – bactérias com atividade β -D-galactosidásica; β -D-GLU – bactérias com atividade β -D-glucuronidásica; LST – Lauril Sulfato Triptose; EC – *Escherichia Coli*; NR – análise não realizada

4.2.1 Quantificação de coliformes totais

Foram detectados coliformes totais em 27 amostras (69,2%), sendo que três amostras foram negativas no meio LST. No meio de Aquateste coli 27 amostras (69,2%) ficaram amarelas caracterizando presença de coliformes totais (Figura 8). No meio verde brilhante 24 amostras (61,5%) turvaram com formação de gás, caracterizando presença de coliformes totais. Schets *et al.* (2002) observaram contagens maiores em meios contendo ONPG do que em meios contendo lactose indicando que uma maior população de bactérias expressando somente o gene *lacZ* resulta em contagens maiores de coliformes totais com ONPG. Coliformes contendo ambos os genes, *lacY* (para β -galactosidase) e *lacZ* (para β -galactosidase) formam colônias características em meios contendo lactose. Outros fatores contribuintes para a contagem mais baixa são a alta seletividade dos meios para contagem de coliformes contendo lactose combinada com um maior número de passos para confirmação. Aproximadamente 10% de coliformes isolados da água potável não fermentam a lactose devido ao bloqueio da β -galactosidase.

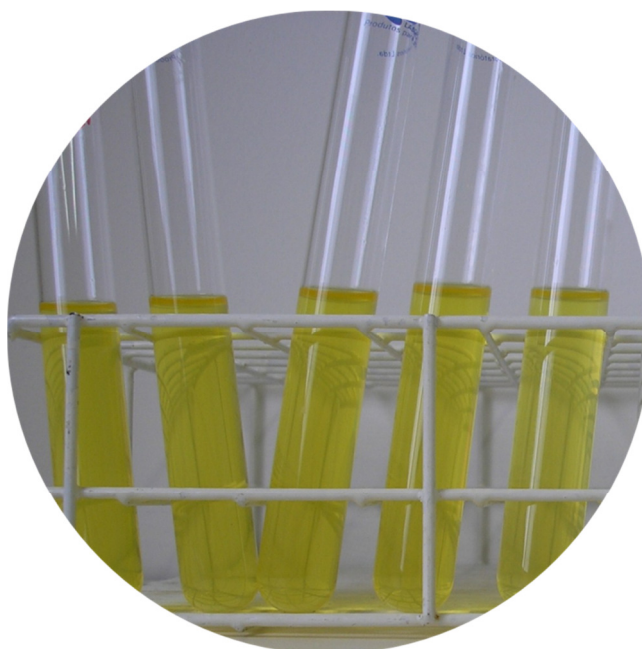


FIGURA 8 – EXEMPLO DE TUBOS POSITIVOS PARA COLIFORMES TOTAIS ATRAVÉS DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO

FONTE – O autor (2010)

A quantificação de coliformes totais, expressa em log (10), nas amostras de águas de fontes alternativas de RMC foi de $1,44 \pm 1,31$ NMP/100mL, com erro padrão da média de 0,15.

A Tabela 7 e o Gráfico 1 demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos de fontes e métodos utilizados para a quantificação de coliformes totais.

TABELA 7 - QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES E MÉTODOS

DE FONTES E MÉTODOS						Limite de Confiança		
		Método	N	Média	Dp	Epm	-95,00%	+95,00%
Total			78	1,44	1,31	0,15	1,15	1,74
Tipo de fonte	Fonte		22	1,55	1,48	0,32	0,89	2,21
	Poço		32	1,65	1,11	0,20	1,25	2,05
	Mina		24	1,07	1,37	0,28	0,49	1,65
Método	LST		39	1,24	1,33	0,21	0,81	1,68
	A coli		39	1,64	1,29	0,21	1,22	2,06
Tipo de fonte Vs. Método	Fonte	LST	11	1,36	1,53	0,46	0,34	2,39
		A coli	11	1,74	1,49	0,45	0,74	2,74
	Poço	LST	16	1,34	1,17	0,29	0,71	1,96
		A coli	16	1,96	0,99	0,25	1,43	2,49
	Mina	LST	12	1,02	1,42	0,41	0,11	1,92
		A coli	12	1,13	1,38	0,40	0,25	2,01

LEGENDA: N – número total de dados; Dp – desvio padrão; Epm – erro padrão da média; LST – lauril sulfato triptose; A coli – Aquatest colí

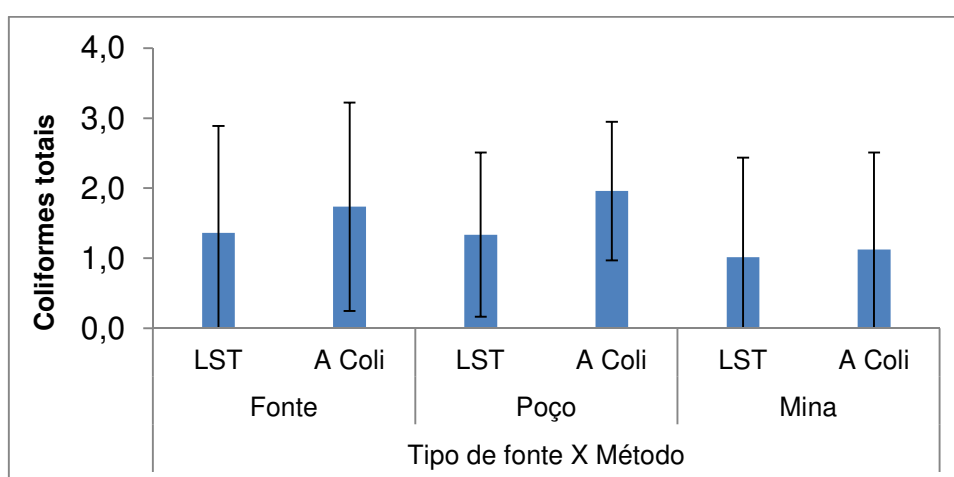


GRÁFICO 1 – COLIFORMES TOTAIS EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES E MÉTODOS

NOTA: A barra de erro representa o erro padrão da média

4.2.2 Quantificação de coliformes termotolerantes

No meio EC 19 amostras (48,7%) ficaram turvas com formação de gás, caracterizando presença de coliformes termotolerantes.

A quantificação de coliformes termotolerantes, expressa em log (10), nas amostras de águas de fontes alternativas de RMC foi de $0,88 \pm 1,16$ NMP/100mL, com erro padrão da média de 0,19.

A Tabela 8 e o Gráfico 2 demonstram que não houve diferença significativa entre os tipos de fontes para a quantificação de coliformes termotolerantes.

TABELA 8 - QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES

	Tipo de fonte	N	Média	Dp	Epm	Limite de Confiança	
						-95,00%	+95,00%
Total		39	0,88	1,16	0,19	0,51	1,26
Tipo de fonte	Fonte	11	0,97	1,42	0,43	0,02	1,92
	Poço	16	0,89	0,96	0,24	0,38	1,40
	Mina	12	0,79	1,24	0,36	0,00	1,58

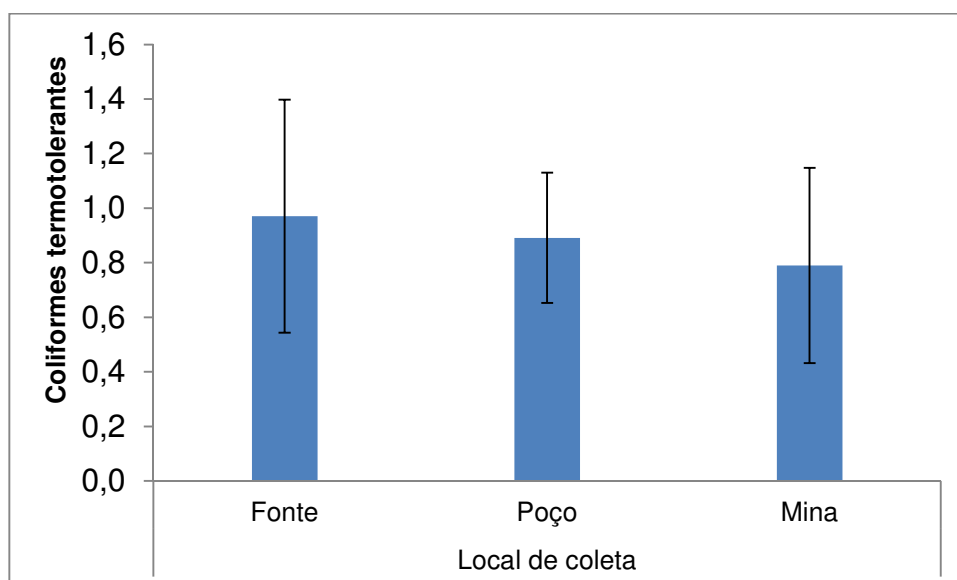


GRÁFICO 2 – COLIFORMES TERMOTOLERANTES EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES
NOTA: A barra de erro representa o erro padrão da média

4.2.3 Quantificação de *E. coli*

No meio de Aquateste coli 16 amostras (41,0%) ficaram fluorescentes caracterizando presença de *E. coli*.

A quantificação de *E. coli*, expressa em log (10), nas amostras de águas de fontes alternativas de RMC foi de $1,18 \pm 1,18$ NMP/100mL, com erro padrão da média de 0,19.

A Tabela 9 e o Gráfico 3 demonstram que não houve diferença significativa entre os tipos de fontes para a quantificação de *E. coli*.

TABELA 9 – QUANTIFICAÇÃO DE *E. coli* LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES

	Tipo de fonte	N	Média	Dp	Epm	Limite de Confiança	
						-95,00%	+95,00%
Total		39	0,74	1,18	0,19	0,36	1,13
Tipo de fonte	Fonte	11	1,02	1,45	0,44	0,04	2,00
	Poço	16	0,65	1,05	0,26	0,09	1,21
	Mina	12	0,61	1,12	0,32	-0,09	1,32

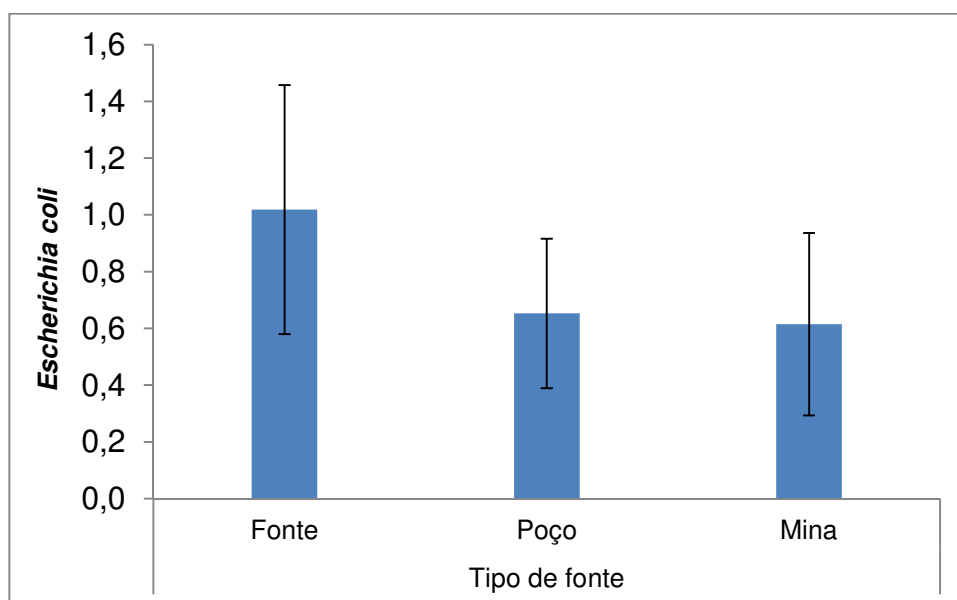


GRÁFICO 3 – *E. coli* EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES

NOTA: A barra de erro representa o erro padrão da média

4.2.4 Quantificação de *Enterococcus* spp

No ágar m-enterococcus formaram colônias vermelhas em 24 amostras (61,5%) (Figura 9a) e no ágar m-EI formaram colônias azuis em 22 amostras (56,4%) (Figura 9b), caracterizando presença de *Enterococcus* spp.

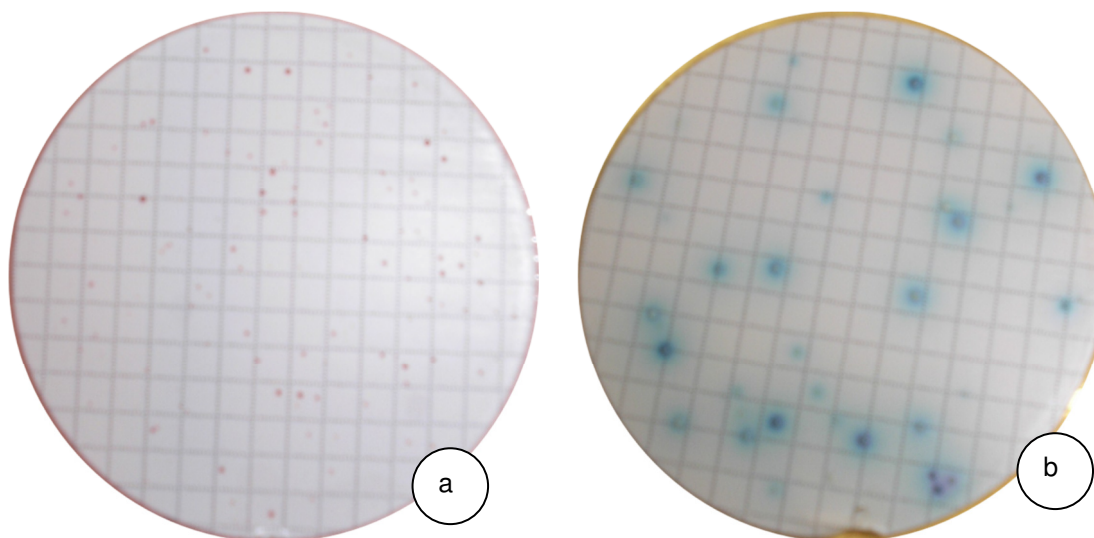


FIGURA 9 - EXEMPLOS DE CRESCIMENTO DOS *Enterococcus* spp EM MEMBRANA FILTRANTE – m-enterococcus (a); m-EI (b)
FONTE – O autor (2010)

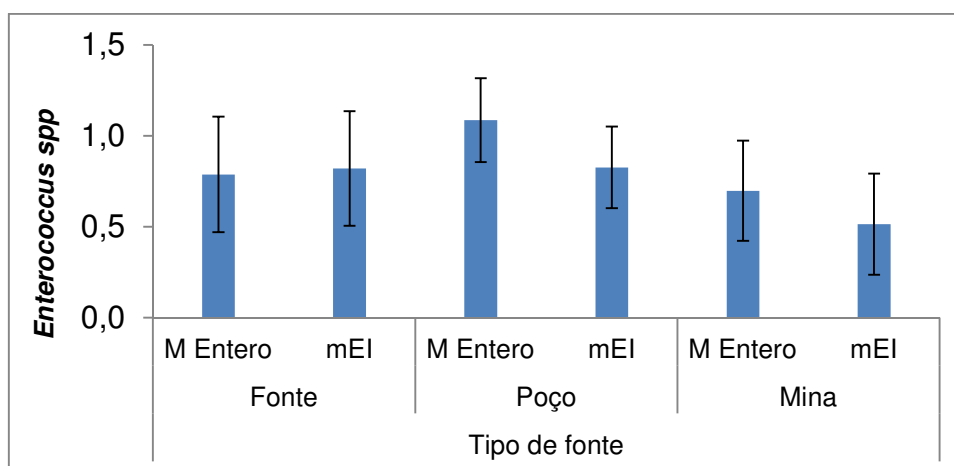
A quantificação de *Enterococcus* spp, expressa em log (10), nas amostras de águas de fontes alternativas de RMC foi de $0,81 \pm 0,95$ UFC/100mL, com erro padrão da média de 0,11.

A Tabela 10 e o Gráfico 4 demonstram que não houve diferença significativa entre os tipos de fontes e métodos utilizados para a quantificação de *Enterococcus* spp.

TABELA 10 - QUANTIFICAÇÃO DE *Enterococcus* spp LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES E MÉTODOS

			Limites de Confiança					
Método			N	Média	Dp	Epm	-95,00%	+95,00%
Total			78	0,81	0,95	0,11	0,59	1,02
Tipo de fonte X Método	Fonte		22	0,80	1,03	0,22	0,35	1,26
	Poço		32	0,96	0,90	0,16	0,63	1,28
	Mina		24	0,61	0,94	0,19	0,21	1,00
Método	m entero		39	0,88	0,96	0,15	0,57	1,19
	mei		39	0,73	0,95	0,15	0,42	1,03
Tipo de fonte X Método	Fonte	m entero	11	0,79	1,05	0,32	0,08	1,50
		Mei	11	0,82	1,05	0,32	0,12	1,52
	Poço	m entero	16	1,09	0,92	0,23	0,60	1,58
		Mei	16	0,83	0,90	0,22	0,35	1,30
	Mina	m entero	12	0,70	0,95	0,28	0,09	1,30
		Mei	12	0,51	0,96	0,28	-0,10	1,13

LEGENDA: m entero – meio m-enterococcus; Mei – meio m-El.

GRÁFICO 4 – *Enterococcus* spp EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES E MÉTODOS

LEGENDA: m Entero – meio m-enterococcus; Mei – meio m-El.

NOTA: A barra de erro representa o erro padrão da média

4.2.5 Quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Enterococcus* spp

A Tabela 11 apresenta os resultados da quantificação de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Enterococcus* spp, expressa em log (10), nos diversos tipos de fontes alternativas de água de RMC.

TABELA 11 - QUANTIFICAÇÃO DE INDICADORES BACTERIANOS LOG (10) NOS DIVERSOS TIPOS DE FONTES

							Limite de Confiança	
	Tipo de fonte	Indicador	N	Média	Dp	Epm	-95,00%	+95,00%
Indicador		C total	78	1,44	1,31	0,15	1,15	1,74
		C termo	39	0,88	1,16	0,19	0,51	1,26
		<i>E. coli</i>	39	0,74	1,18	0,19	0,36	1,13
		<i>Enterococcus</i> spp	78	0,81	0,95	0,11	0,59	1,02
Local de coleta Vs. Indicadores	Fonte	C total	22	1,55	1,48	0,32	0,89	2,21
		C termo	11	0,97	1,42	0,43	0,02	1,92
		<i>E. coli</i>	11	1,02	1,45	0,44	0,04	2,00
		<i>Enterococcus</i> spp	22	0,80	1,03	0,22	0,35	1,26
	Poço	C total	32	1,65	1,11	0,20	1,25	2,05
		C termo	16	0,89	0,96	0,24	0,38	1,40
		<i>E. coli</i>	16	0,65	1,05	0,26	0,09	1,21
		<i>Enterococcus</i> spp	32	0,96	0,90	0,16	0,63	1,28
	Mina	C total	24	1,07	1,37	0,28	0,49	1,65
		C termo	12	0,79	1,24	0,36	0,00	1,58
		<i>E. coli</i>	12	0,61	1,12	0,32	-0,09	1,32
		<i>Enterococcus</i> spp	24	0,61	0,94	0,19	0,21	1,00

LEGENDA: N – número total de dados; Dp – desvio padrão; Epm – erro padrão da média; C total – coliformes totais; C termo – coliformes termotolerantes

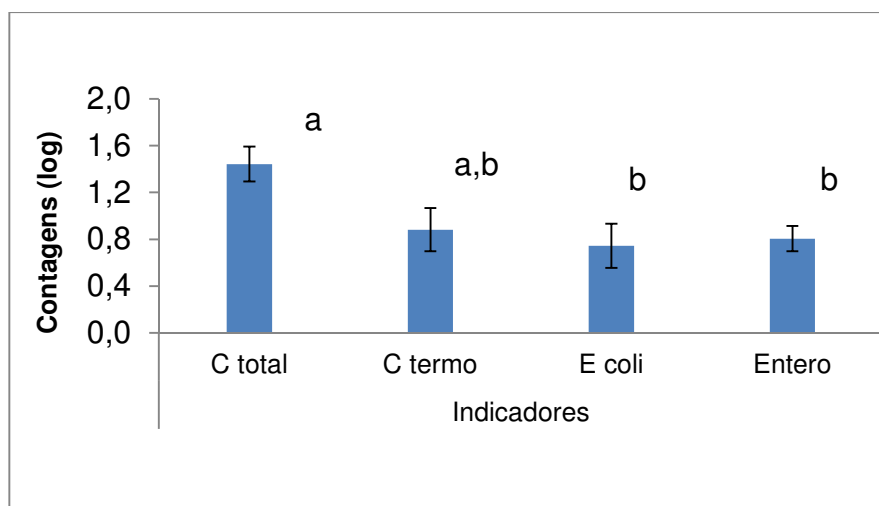


GRÁFICO 5 – INDICADORES BACTERIANOS EM DIVERSOS TIPOS DE FONTES

LEGENDA: C. total – coliformes totais; C termo – Coliformes termotolerantes; Entero – *Enterococcus* spp

NOTA: A barra de erro representa o erro padrão da média

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$; teste de Tukey)

O Gráfico 5 demonstra que entre a contagem de coliformes totais e termotolerantes não tem diferença estatisticamente significativa (a), e que entre a contagem de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Enterococcus* spp não tem

diferença estatisticamente significativa (b). As letras a e b apontam que há diferença estatisticamente significativa entre as contagens.

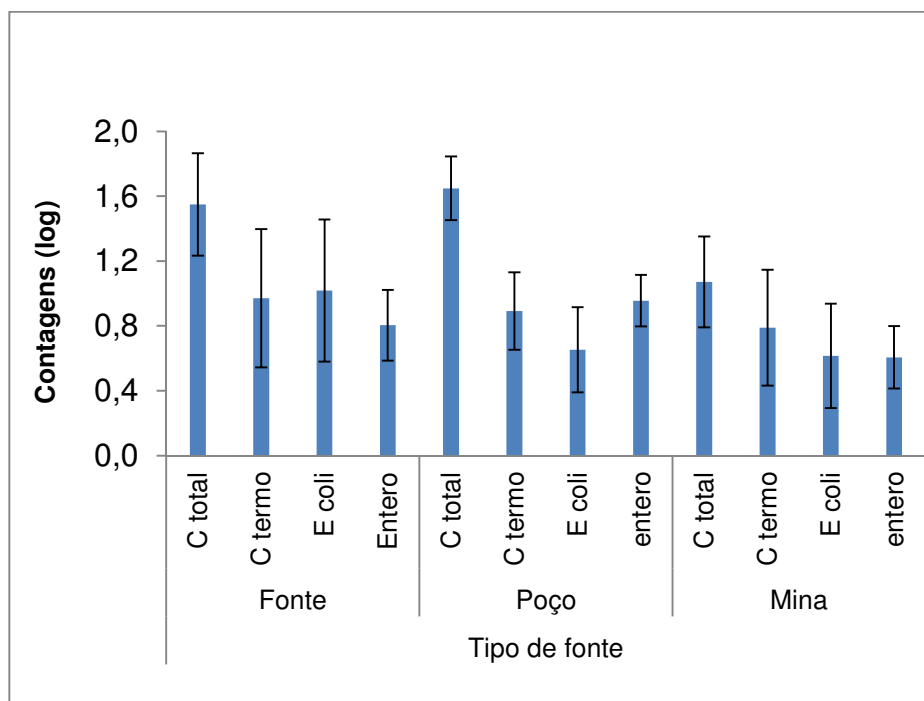


GRÁFICO 6 – MICRO-ORGANISMOS TOTAIS POR TIPO DE FONTES

NOTA: A barra de erro representa o erro padrão da média

LEGENDA: C. total – coliformes totais; C termo – Coliformes termotolerantes; Entero – *Enterococcus* spp

O Gráfico 6 demonstra que, águas disponíveis em fontes de parques públicos, minas ou poços de Curitiba e região metropolitana apresentaram-se com contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* superiores ao permitido na Portaria 518/2004 e contagem de *Enterococcus* spp superiores ao permitido na RDC 275/2005.

Os resultados obtidos por Yamanaka *et al.* (2010d), que monitoraram a qualidade microbiológica de água de fontes alternativas em três parques de Curitiba durante 12 meses mostram que não houve diferença significativa entre os períodos avaliados.

De acordo com Yamanaka *et al.* (2010a; 2010b), considerando-se maior positividade de *Enterococcus* spp (60,5%) quando comparado ao indicador *E. coli* (36,8%), os resultados sugerem a necessidade de inclusão de *Enterococcus* spp na avaliação da potabilidade da água de consumo.

A incidência de amostras contaminadas por coliformes totais foi de 59% quando o método de tubos múltiplos por fermentação da lactose em caldo lauril sulfato triptose foi utilizado. Este índice aumentou para 69,2% quando o substrato cromogênico Aquateste coli® foi utilizado. Dentre as amostras que apresentaram contaminação por coliformes, 59% apresentaram-se contaminado por *E. coli*. De um total de 39 amostras, 19 amostras apresentaram-se contaminadas por coliformes termotolerantes, representando uma incidência de 48,7% de amostras não potáveis quando o método de fermentação da lactose em caldo EC foi utilizado e, 16 amostras apresentaram-se contaminadas por *E. coli*, representando 41% de amostras não potáveis, quando o método cromogênico e fluorogênico em Aquateste coli® foi utilizado. Yamanaka e Vianna (2003) reportaram que 65% das amostras de fontes alternativas de dois bairros do município da Fazenda Rio Grande, sem desinfecção, apresentaram contaminação por coliformes totais, sendo que 80% destes apresentaram-se contaminadas por *E. coli*. Resultados similares foram obtidos por Oliveira (2008) pesquisando coliformes totais e fecais em águas de 34 fontes alternativas na zona rural de Formiga (MG) sendo que 68% apresentaram-se contaminados por coliformes totais. Dos 13 poços rasos analisados, 31% apresentaram água potável. Das 13 nascentes analisadas, apenas uma delas (8%) apresentou água de boa qualidade. Dentre os oito poços profundos analisados, 25% apresentaram contaminação por coliformes totais e fecais.

A incidência de amostras contaminadas por *Enterococcus* spp foi de 61,5% quando ágar m-enterococcus foi utilizado, ao passo que 56,4% de amostras apresentaram-se contaminadas quando o método cromogênico ágar m-EI foi utilizado. Considerando o resultado obtido através dos dois métodos utilizados, este índice aumentou para 66,7% (Gráfico 7). Gomes (2007) não isolou *Enterococcus* spp nas 30 amostras de água analisadas nos meios Bile Esculina (BE) e Kanamicina Esculina Azida (KEA).

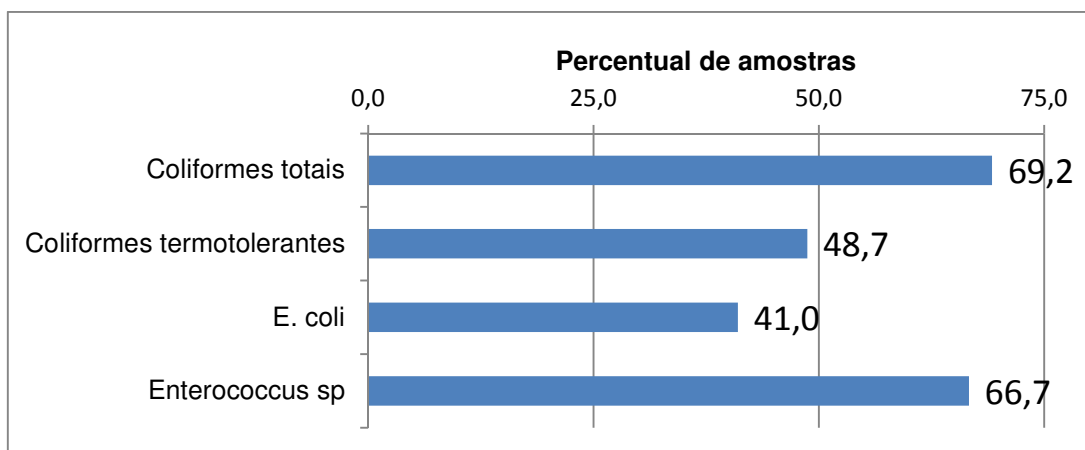


GRÁFICO 7 - INCIDÊNCIA DE COLIFORMES TOTAIS, COLIFORMES TERMOTOLERANTES, *E. coli* E *Enterococcus spp*

4.2.6 Incidência de bactérias termotolerantes com atividade enzimática nas amostras de água de fontes alternativas pelo método do substrato cromogênico

No ágar Cromoclin US® isolaram-se colônias azuis em 31 das 35 amostras analisadas por este método, devido à presença de bactérias com atividade β -D-glicosidásica (β -D-GLIC) e/ou β -D-galactosidásica + β -D-glicosidásica (β -D-GAL+ β -D-GLIC) sugerindo a presença de bactérias termotolerantes com atividade enzimática e/ou *Enterococcus spp* e colônias magenta em 22 amostras, devido à presença de bactérias com atividade β -D-glucuronidásica (β -D-GLU) e/ou β -D-galactosidásica (β -D-GAL) sugerindo a presença de *E. coli* (Figura 10). Conforme apresentado no gráfico 8, a incidência de indicadores bacterianos de potabilidade em meios de cultura específicos foi menor.

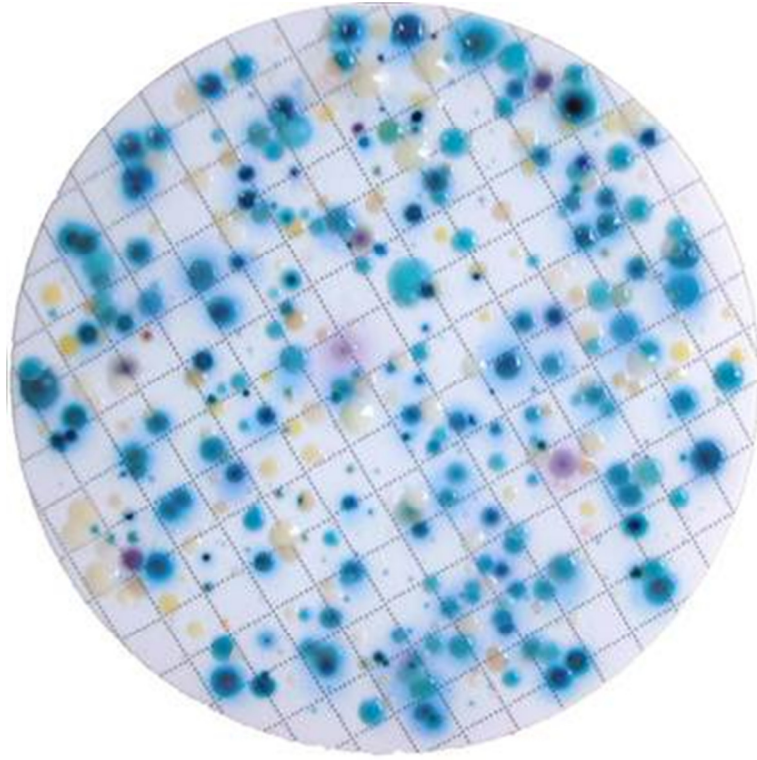


FIGURA 10 - EXEMPLO DE CRESCIMENTO BACTERIANO NO ÁGAR CROMOGÊNICO CROMOCLIN US®

FONTE – O autor (2010)

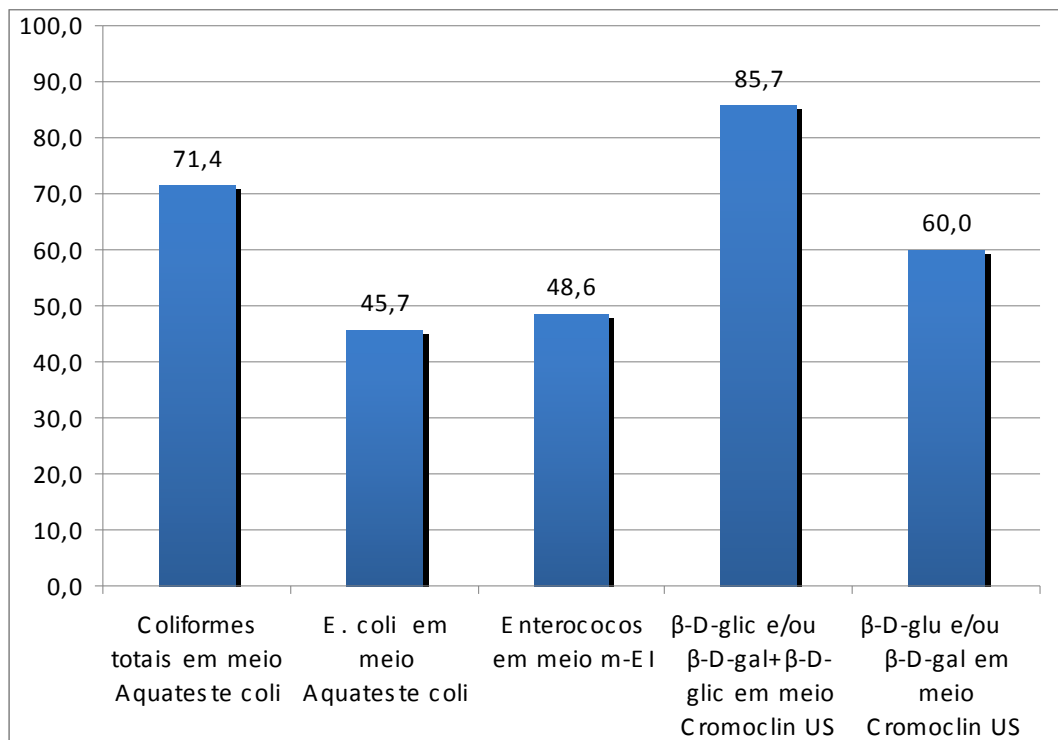


GRÁFICO 8- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DOS MEIOS CONTENDO SUBSTRATOS CROMOGÊNICOS

LEGENDA: β-D-GAL – bactérias com atividade β-D-galactosidásica; β-D-GLIC – bactérias com atividade β-D-glicosidásica; β-D-GLU – bactérias com atividade β-D-glucuronidásica

Yamanaka *et al.* (2010c), detectaram coliformes e/ou *Enterococcus* spp em vinte e nove amostras (82,8%) por um método padrão e o método alternativo avaliado apresentou sensibilidade relativa de 103,4%, sugerindo o uso deste meio de cultura como método de triagem para pesquisa simultânea de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Enterococcus* spp em água trazendo como benefícios a facilidade de uso com baixo custo, não necessitando de recursos elevados para análise laboratorial.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE ENTRE OS MÉTODOS EMPREGADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES E *Enterococcus* spp

Conforme Tabela 12, a acurácia relativa do método alternativo cromogênico, para pesquisa de coliformes foi de 89,7% com sensibilidade relativa de 100,0% e especificidade relativa de 75,0%. O método alternativo cromogênico, para pesquisa de coliformes apresentou desvio positivo, onde quatro amostras foram negativas para o método convencional por fermentação de lactose e positivas para β -D-galactosidase. Estudos realizados por Beux *et al.* (2010) demonstram que o método alternativo “Aquateste coli®” apresentou especificidade relativa de 93,9% para pesquisa de coliformes totais quando comparado ao método convencional, e concluiu o desvio positivo tendo em vista que os testes bioquímicos realizados para as amostras divergentes identificaram *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* e *Hafnia alvei*. A especificidade relativa do método para pesquisa de *E. coli* foi de 100%. Kampfner *et al.* (2008), determinaram a acurácia do método tradicional baseado em produção de gás a partir da fermentação da lactose, para a pesquisa de coliformes totais em águas de três reservatórios para tratamento, comparado ao método cromogênico Colilert-18, baseado na pesquisa da enzima β -galactosidase. A água bruta foi escolhida por apresentar um amplo espectro de micro-organismos. O resultado foi de 95% de positividade com o método cromogênico e 15% de positividade com o método da produção de ácido e gás a partir da fermentação da lactose. O sequenciamento dos genes 16S Rrna e hsp60 dos isolados resultaram na identificação de *Enterobacter nimipressuralis*, *E.*

amnigenus, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, e *Serratia fonticola* como predominantes. Estas espécies são β -galactosidase positivos, no entanto geralmente a produção de ácido a partir da lactose ocorre após um tempo de incubação prolongado.

TABELA 12 - ACURÁCIA, SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MÉTODOS CROMOGÊNICOS PARA COLIFORMES TOTAIS E *Enterococcus* spp

	PA	NA	ND	PD	Total	AC (%)	N ₊	SE (%)	N.	SP (%)
Coliformes totais	23	12	0	4	39	89,7	23	100,0	16	75,0
<i>Enterococcus</i> spp	18	12	6	3	39	76,9	24	75	15	80,0

LEGENDA: PA – concordância positiva; NA – concordância negativa; ND – desvio negativo; PD – desvio positivo; AC – acurácia relativa; SE – sensibilidade relativa; SP – especificidade relativa; N. – número total de resultados negativos com o método de referência; N₊ – número total de resultados positivos com o método de referência

A acurácia relativa do método alternativo, cromogênico, para pesquisa de *Enterococcus* spp foi de 76,9% com especificidade relativa de 80,0% e sensibilidade relativa de 75,0%. De acordo com Domig, Mayer e Kneifel (2003), não tem um método que atenda universalmente todos os requisitos para o isolamento do *Enterococcus* spp. De acordo com a natureza e nível da microflora acompanhante, certos substratos e modificações devem ser utilizados, levando a diversas vantagens e desvantagens.

4.4 AVALIAÇÃO DA POTABILIDADE DA ÁGUA DE FONTES ALTERNATIVAS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA

Conforme apresentado no Gráfico 9, as amostras de água dos pontos 2, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 22, 23, 24, 26, 27 e 37 foram consideradas potáveis pelos padrões legais vigentes, isto é ausência de coliformes termotolerantes ou *E. coli*.

Das 39 amostras analisadas, 21 (53,8%) foram consideradas não potáveis por revelarem presença de coliformes termotolerantes e/ou *E. coli*. 18 (46,2%) amostras foram consideradas potáveis pelos padrões legais sendo que, dentre estes, um total de seis amostras apresentaram-se contaminados por *Enterococcus* spp.

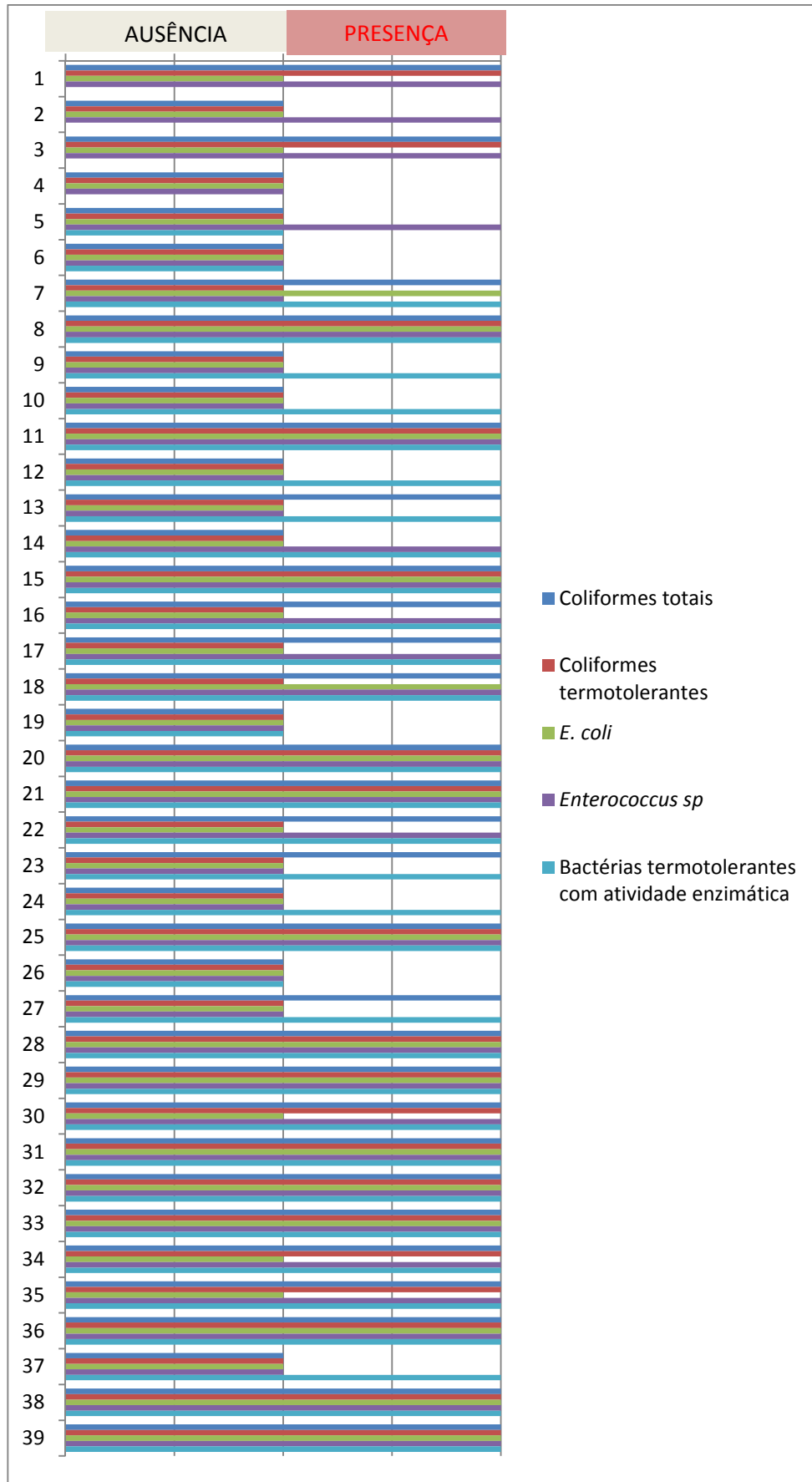


GRÁFICO 9 - DEMONSTRATIVO DE PONTOS COM PRESENÇA E AUSÊNCIA DE

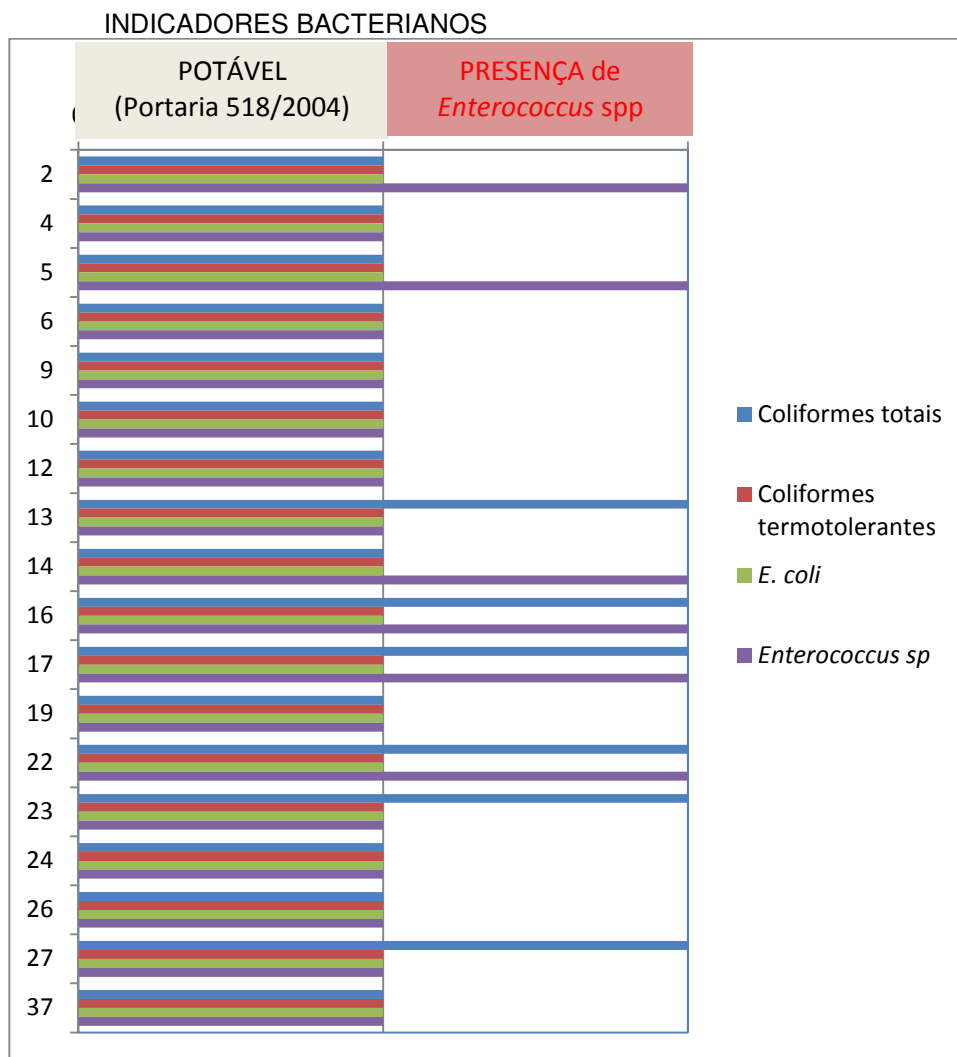


GRÁFICO 10 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS PONTOS LEGALMENTE POTÁVEIS

O Gráfico 10 demonstra que as amostras de águas dos poços (pontos 16 e 22), de minas (pontos 14 e 17) e de fontes (pontos 2 e 5), consideradas legalmente potáveis, não devem ser consumidas por se apresentarem contaminados por *Enterococcus spp.*

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE *E. coli* E *Enterococcus* spp ATRAVÉS DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS

4.5.1 Identificação de *E. coli*

Foram selecionados 23 isolados de *E. coli* cuja identificação dos mesmos foi realizada em ordem numérica. Seis foram isolados em caldo lauril sulfato triptose, 12 foram isolados em caldo Aquateste coli® e 5 foram isolados em ágar cromogênico Cromoclin US®. Os isolados de *E. coli* foram confirmados quando se apresentaram como bacilos Gram-negativo, teste de oxidase negativo e caracterizados bioquimicamente no sistema Bactray 1 e 2.

A Figura 11 representa a reação à *E. coli* no sistema Bactray.

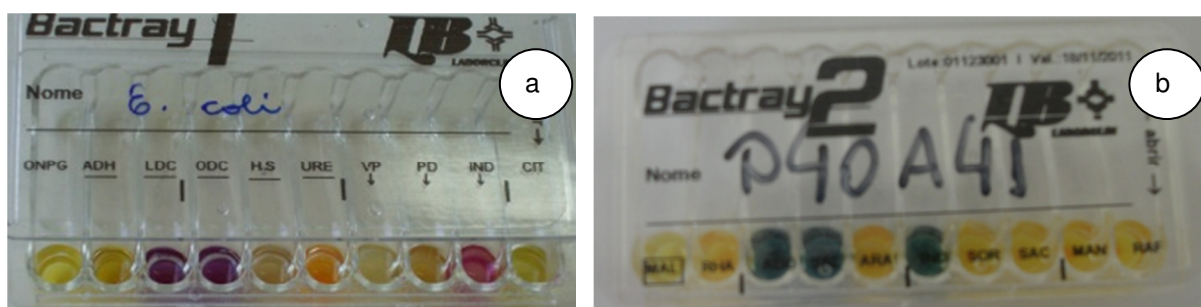


FIGURA 11 - EXEMPLO DE REAÇÕES BIOQUÍMICAS PARA *E. coli* NO SISTEMA BACTRAY 1 (a) E 2 (b)

FONTE – O autor (2010)

4.5.2 Identificação de *Enterococcus* spp

Os isolados de *Enterococcus* spp foram confirmados quando se apresentaram como colônias azuis em meio Cromoclin US® (Figura 12a), cocos Gram-positivo (Figura 12b), teste de catalase negativo (Figura 12c), crescimento em bile esculina, crescimento a 45°C (Figura 12d), crescimento em presença de 6,5% de cloreto de sódio (Figura 12e) e com reação positiva ao teste de PYR (Figura 12f).

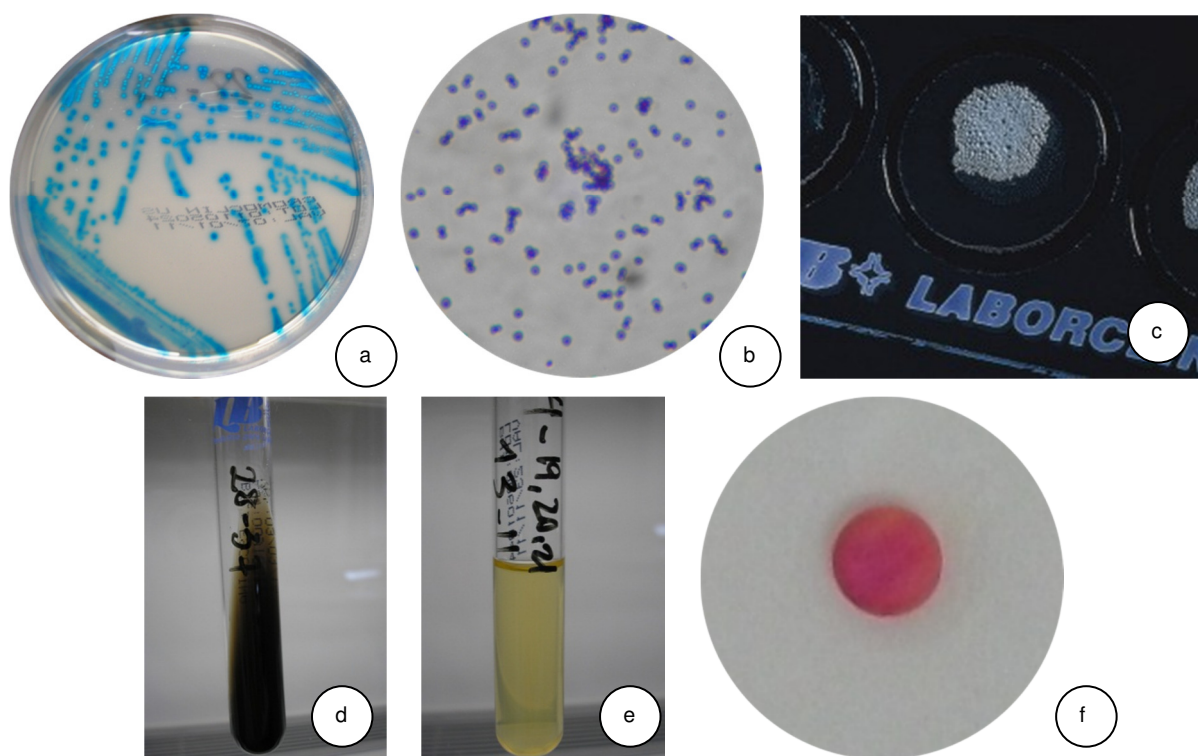


FIGURA 12 - EXEMPLOS DE REAÇÃO DOS *Enterococcus* spp —cor azul no ágar Cromoclin US® (a); coco Gram-positivo (b); teste de catalase (c); bile esculina (d); meio de tolerância ao sal (e); PYR teste (f)

FONTE – O autor (2010)

Os isolados de *Enterococcus* spp foram diferenciados através de prova de carboidratos disponíveis no sistema miniaturizado Bactray 2. A coloração amarela foi considerada reação positiva para a fermentação do carboidrato e a coloração azul ou verde foi considerada negativa, conforme Figura 13.

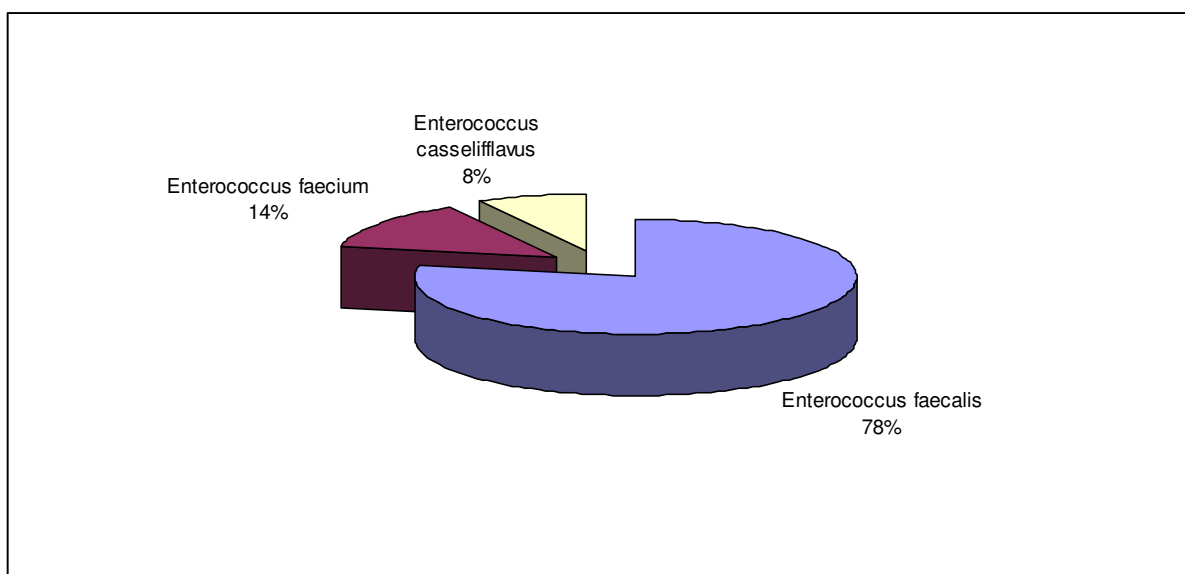


FIGURA 13 - EXEMPLOS DE PROVAS DE FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS POR

Enterococcus spp NO SISTEMA BACTRAY 2

FONTE – O autor (2010)

Foram identificados 29 *E. faecalis* (78%), 5 *E. faecium* (14%) e 3 *E. casseliflavus* (8%), conforme apresentado no Gráfico 11. Nos pontos 1, 11, 25, 32 e 33 houveram recuperação de mais de uma espécie de *Enterococcus* spp. Gomes (2007) isolou 812 colônias com morfologia indicativa do gênero *Enterococcus* spp nos meios Bile Esculina (BE) e Kanamicina Esculina Azida (KEA), a partir de alimentos, onde 37% foram caracterizados bioquimicamente. Após identificação por PCR obteve-se 46,5% de *E. faecium*, 26,8% de *E. faecalis*, 12% de *E. casseliflavus* e 2,7% de *E. gallinarum* e 12% não identificado com os primers utilizados. Realizou identificação em 52 isolados utilizando API 20 STREP (Biomérieux, França), que se comparando com os resultados de PCR, 78,8% foram erroneamente identificados. Segundo Facklam *et al.* (1995) a reação de PYR em discos individuais difere da reação obtida no sistema API 20 STREP.

GRÁFICO 11 – FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES DE *Enterococcus* spp

4.6 PESQUISA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE *E. coli* E *Enterococcus* spp, ATRAVÉS DE MÉTODOS FENOTÍPICOS

4.6.1 Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de *E. coli*

Nenhum isolado de *E. coli* apresentou soroaglutinação com soro polivalente para *E. coli* clássica, enteroinvasora e O157.

Farah (2005) observou a presença de STEC em 57% dos bovinos no estado do Paraná.

Said *et al.* (2003) avaliaram 69 surtos associados à água potável na Inglaterra e país de Gales, onde 36% foram atribuídos ao uso de água de poços particulares. Apesar de o principal agente etiológico ter sido o *Campylobacter* (52%), 1 surto foi associado à *E. coli* O157 pelo consumo de suco de frutas preparada com água de poço não tratada da fazenda.

Lee *et al.* (2002) avaliaram 39 surtos associados à água potável reportados por 25 estados nos Estados Unidos. 71,8% estavam associados ao uso de água de poços subterrâneos sendo que 18 surtos estavam associados ao uso de água de poços particulares ou não comunitários não regulados pelo EPA. *E. coli* O157:H7 foi isolado em 5 surtos, dentre 9 ocasionados por bactérias. Um surto por *E. coli* O157:H7 envolvendo 781 casos ocorreu em Nova York onde foi usada água de poços rasos não clorada para preparar bebidas e gelo por alguns vendedores numa feira primariamente servida por água potável clorada. Vinte e dois casos de doença por *E. coli* O157:H7 ocorreram pela ingestão de água servida pelo município numa cidade do Texas, onde dados de controle de controle indicaram cloração inadequada da água durante semanas.

Segundo Eaton *et al.* (2005), para isolamento de *E. coli* O157:H7 na água, a técnica deve ser modificada pois esta fermenta a lactose com formação de gás, no entanto não hidrolisa MUG. Alíquotas de tubos positivos para técnica de fermentação dos coliformes totais são semeadas na superfície do ágar MacConkey sorbitol e incubada a 35°C por 18 a 24 horas. Selecionar colônias incolores e

transferir ao caldo Lauril triptose contendo 0,1g/L de MUG e incubar a 35 °C por 18 a 24 horas. Para EIEC, que fermenta a lactose lentamente ou não fermenta totalmente, a técnica do NMP não é recomendada, podendo usar a técnica da filtração em membrana, selecionando colônias lactose positiva e lactose negativa para identificação bioquímica.

4.6.2 Caracterização fenotípica dos fatores de virulência dos isolados de *Enterococcus* spp

A frequência de isolados que apresentaram fatores de virulência caracterizados fenotipicamente para presença da enzima β -lactamase, para as provas de gelatinase, caseinase e hemolisina, conforme demonstrado na Figura 14 estão apresentados na Tabela 13.

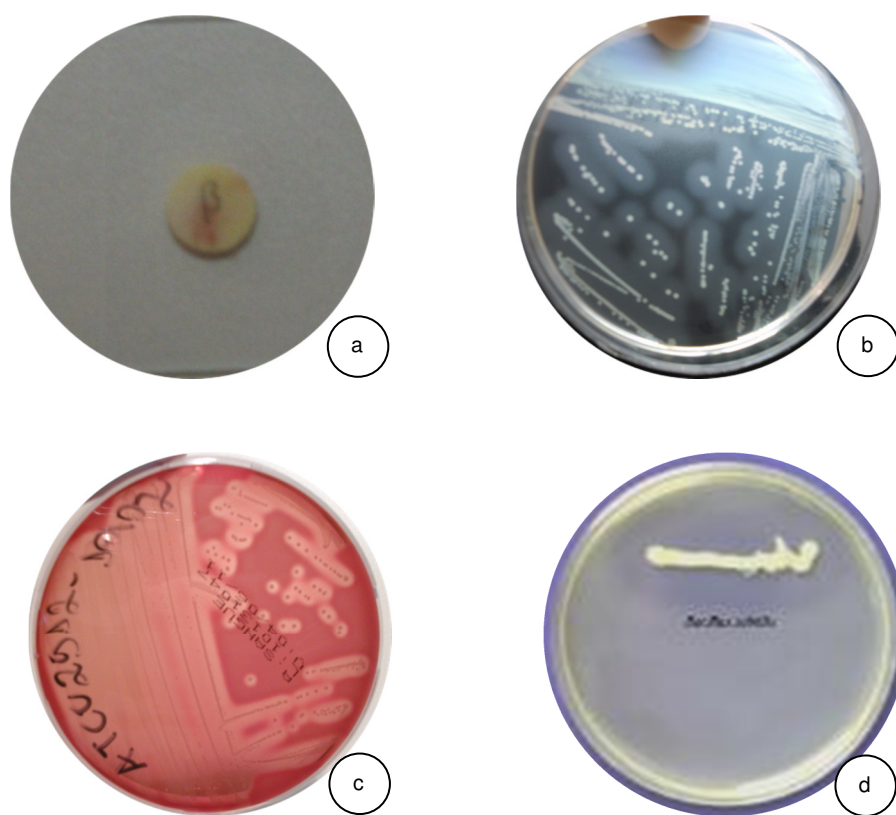


FIGURA 14 - EXEMPLO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus* spp – disco de beta-lactamase (a); prova de gelatinase (b); produção de hemolisina (c); produção de caseinase (d)
FONTE – O autor (2010)

Como apresentado na Tabela 13, a frequência de isolados de *Enterococcus* spp apresentando fatores de virulência foi de, 15 (40,5%) para prova de gelatinase e 16 (43,2%) para prova de caseinase. Com relação à prova de hemolisina, 13 isolados (35,1%) apresentaram hemólise, sendo 5 isolados (13,5%) com alfa-hemólise (isolados 14, 15, 38, 49 e 58), 4 isolados (10,8%) com β -hemólise (11, 17, 19 e 52) e 4 isolados (10,8%) com hemólise gama (isolados 14, 27, 31 e 34). Treze (35,1%) isolados apresentaram reação positiva a dois fatores avaliados. O isolado 27 apresentou as provas da gelatinase, caseinase e hemolisina positivas. Este foi identificado com *E. faecium* e apresentou multirresistência para os antibióticos eritromicina, rifampicina e tetraciclina. Como controle positivo para β -hemólise foi utilizada cepa *E. faecalis* ATCC 29212. Apenas o isolado 55, identificado como *E. faecalis*, apresentou β -lactamase positiva. A pesquisa da atividade hemolítica realizada por Gomes (2007) revelou que 81% apresentaram alfa-hemólise, 12% β -hemólise e 7% não apresentaram hemólise. O perfil β -hemolítico foi observado em 38,7% isolados de *E. faecalis*.

TABELA 13– FREQUÊNCIA DE FATORES FENOTÍPICOS DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus* spp

Fator de virulência	nº de amostras	% das amostras
Gelatinase	15	40,5
Caseinase	16	43,2
Hemolisina	13	35,1
Beta lactamase	1	2,7

Gomes (2007) observou que 60% de *E. faecalis* produziram gelatinase e as demais espécies não apresentaram resultado positivo.

A ocorrência de fatores de virulência em vinte e nove *E. faecalis* isolados de pacientes com endocardite ou bacterímia ou a partir de fezes de voluntários saudáveis foi determinada. Os isolados apresentaram proteína de superfície de *Enterococcus* spp (72,4%), a gelatinase (58,6%), substância de agregação (48,3%) e citolisina (17,2%). A aderência bacteriana não foi significativamente associada com qualquer um desses fatores de virulência (ARCHIMBAUD *et al.*, 2002).

VREFS e *E. faecalis* sensíveis à vancomicina do Brasil foram pesquisadas quanto à presença de fatores de virulência demonstrando que um conjunto de fatores parece ser mais comum: gelatinase, substância de agregação e esp (GEA).

Esses fatores são importantes porque têm sido implicados na célula agregação e formação de biofilme. A formação de biofilme pode promover a conjugação de plasmídios abrigando resistência e genes de virulência, aumentando a probabilidade de entrada de novos genes de resistência em espécies (CAMARGO *et al.*, 2008).

Os fatores de virulência gelatinase, substância de agregação e proteína de superfície de *Enterococcus* spp estão presentes concomitantemente na maioria dos VREFS com fenótipo VanA que estão disseminados no Brasil (CAMARGO; DARINI, 2005).

Vergis *et al.* (2002), determinaram a presença do gene *esp* e produção de gelatinase e hemolisina em 219 isolados de *E. faecalis*, provenientes de pacientes com bacteremia, onde 32% dos isolados carregavam gene *esp*, 64% produziram gelatinase e 11% produziram hemolisina.

4.7 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE *E. coli* E *Enterococcus* spp, ATRAVÉS DE MÉTODOS GENOTÍPICOS

Nenhum isolado de *E. coli* pesquisado apresentou genes diarreogênicos.

A frequência de isolados de *Enterococcus* spp apresentando gene de virulência *ace* foi de 13 (35,1%). Os isolados que apresentaram o gene *ace* foram 1, 6, 7, 34, 39, 42, 45, 51, 52, 53, 57 e 58, conforme apresentado na Figura 15. Gomes (2007) observou o gene *ace* em 2,1% dos isolados de *E. faecium*. Por outro lado, 97,5% dos isolados de *E. faecalis* expressaram o gene *ace*.

Todas as amostras negativas submetidas a uma reação de PCR para o gene 16S foram positivas para esse gene, confirmando a qualidade da extração e dos reativos utilizados, o que valida os resultados negativos.

O gene da adesina, *acm*, foi encontrado em 100% das 32 amostras de *E. faecium* isoladas nos Estados Unidos (NALLAPAREDDY; WEINSTOCK; MURRAY, 2003).

O gene *acm* foi detectado em 93,5% das amostras de *E. faecium*. No entanto, sabe-se que a presença deste gene não prediz que todas produzem a adesina de superfície, apenas que *acm* também está presente na grande maioria

das amostras de *E. faecium* do Brasil e que pode ser um marcador epidemiológico desta espécie (CAMARGO; DARINI, 2005).

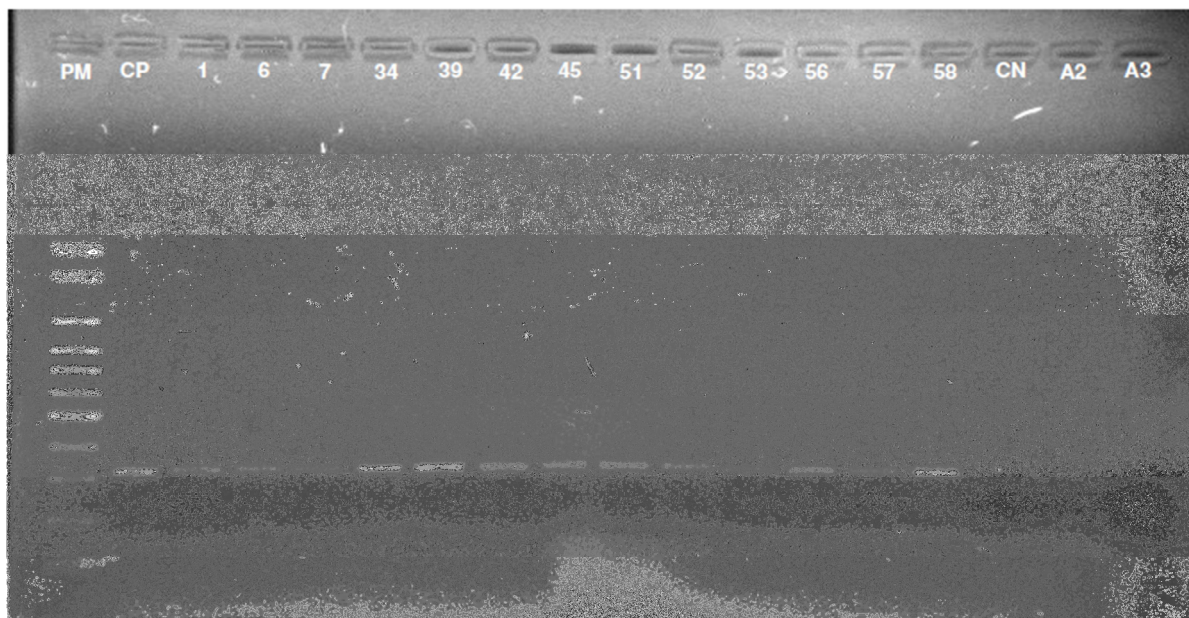


FIGURA 15 – ELETROFORESE DA PESQUISA DO GENE *ace*

LEGENDA: PM- peso molecular; CP- controle positivo; 1, 6, 7, 34, 39, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 57 e 58- amostras positivas; CN- controle negativo; A2- amostra clínica 2; A3- amostra clínica 3

4.8 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS APRESENTADOS PELOS ISOLADOS DE *E. coli* E *Enterococcus* spp ATRAVÉS DO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO

4.8.1 Determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de *E. coli*

Os halos de inibição formados, conforme Figura 16, foram medidos com paquímetro. A frequência de resistência antimicrobiana apresentada pelos isolados de *E. coli*, através do método de disco-difusão está apresentada na Tabela 14. Dentre os 23 isolados avaliados, todos foram sensíveis à cefoxitina, gentamicina, ciprofloxacina, amicacina e cefepime, no entanto, somente nove (39,1%) foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Seis (26,1%) isolados foram considerados

multidroga resistentes, isto é, resistentes a mais de um antibiótico testado, sendo que o isolado 43 apresentou resistência a quatro dos 12 antimicrobianos avaliados, e resistência intermediária a dois antimicrobianos, representando sensibilidade somente à metade dos antibióticos avaliados.



FIGURA 16 – EXEMPLO DE ANTIBIOGRAMA DE *E.coli* COM MULTIDISCO GRAM-NEGATIVO
FONTE – O autor (2010)

TABELA 14 – FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE *E. coli*

Antibiótico	Concen- tração	Resistente		Sensibilidade Intermediária		Sensível	
		nº	%	nº	%	nº	%
Cefoxitina	30µg	0	0,0	0	0,0	23	100,0
Gentamicina	10µg	0	0,0	0	0,0	23	100,0
Amoxicilina/ ácido Clavulânico	20/10µg	1	4,3	1	4,3	21	91,3
Ciprofloxacina	5µg	0	0,0	0	0,0	23	100,0
Cefuroxima	30µg	0	0,0	5	21,7	18	78,3
Cefalotina	30µg	0	0,0	4	17,4	19	82,6
Sulfazotrim	25µg	1	4,3	0	0,0	22	95,7
Ampicilina	10µg	2	8,7	1	4,3	20	87,0
Meropenem	10µg	2	8,7	5	21,7	16	69,6
Amicacina	30µg	0	0,0	0	0,0	23	100,0

Ceftazidima	30µg	1	4,3	0	0,0	22	95,7
Cefepime	30µg	0	0,0	0	0,0	23	100,0

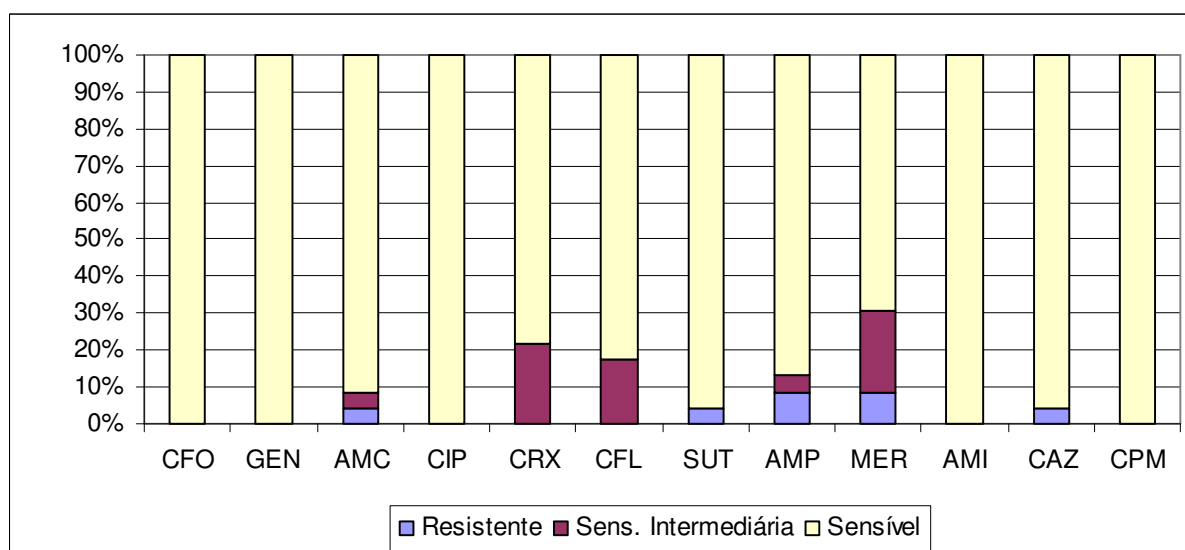


GRÁFICO 12 – FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE *E. coli*
 LEGENDA: CFO – cefoxitina; GEN – gentamicina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; CIP – ciprofloxacina; CRX – cefuroxima; CFL – cefalotina; SUT – sulfazotrim; AMP – ampicilina; MER – meropenem; AMI – amicacina; CAZ – ceftazidima; CPM – cefepime

Os antibióticos que apresentaram maior índice de resistência foram meropenem onde sete isolados (30,4%) apresentaram-se resistentes ou com sensibilidade intermediária, seguido de cefuroxima onde cinco (21,7%) apresentaram sensibilidade intermediária (Gráfico 12). Coleman (2008) detectou resistência antimicrobiana em 41% dos isolados de *E. coli* em swabs de 699 participantes da pesquisa, com 28% resistentes a ampicilina, 25% a tetraciclina e 24% a sulfisoxazole, e 29% foram multidroga resistentes. Indivíduos que usavam água não tratada contaminada com *E. coli* resistentes a antibióticos tinham uma probabilidade maior ou igual a 40% de carrear esses micro-organismos no sistema gastrointestinal do que aqueles usando água não contaminada, mesmo após o ajuste para o efeito de outras variáveis. Patoli, Patoli e Mehraj (2010) analisaram 42 amostras de água consumida pela população na cidade de Hyderabad, Paquistão, e em 27 (64,29%) foram isoladas *E. coli*. A resistência antimicrobiana foi observada em ácido nalidíxico (92,6%), seguido por ampicilina (88,89), ceftriaxona (40,74%), ciprofloxacina (37,04%), ceftazidima (25,23%), cefotaxima (18,52%), e gentamicina (18,52%). Por outro lado, nenhum dos isolados de *E. coli* apresentaram resistência à amicacina. Multidroga resistência (3-6 antimicrobianos) foi observada em 62,96% de *E. coli* isolados.

4.8.2 Determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de *Enterococcus* spp

Os halos de inibição formados, conforme Figura 17, foram medidos com paquímetro. A determinação da resistência a antibióticos apresentados pelos isolados de *Enterococcus* spp, realizada através do método de disco-difusão mostrou que dentre os 37 isolados de *Enterococcus* spp, todos foram sensíveis à vancomicina e ampicilina, no entanto somente nove (24%) foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Os antibióticos que apresentaram maior índice de resistência foram a eritromicina onde 8 (21,6%) foram sensíveis, a rifampicina onde 18 (48,6%) foram sensíveis, seguido de tetraciclina onde 20 (54,1%) foram sensíveis. 14 (37,8%) isolados foram considerados multidroga resistentes, isto é, resistentes a mais de um antibiótico testado. O antibiótico ciprofloxacina, que apresentou sensibilidade frente a todas as cepas de *E. coli* avaliadas, não apresentou o mesmo perfil para *Enterococcus* spp, onde 14 (37,8%) isolados apresentaram resistência. Por outro lado, para o antibiótico, ampicilina em que todas as cepas de *Enterococcus* spp se mostraram sensíveis, três (13%) isolados de *E. coli* apresentaram-se resistentes (Tabela 15). Do total de isolados de *Enterococcus* spp nesta pesquisa, 14 (37,8%) apresentaram resistência ao ciprofloxacina, 4 (10,8%) ao cloranfenicol, 29 (78,4%) à eritromicina, 5 (13,5%) à penicilina, 19 (51,3%) à rifampicina, 17 (45,9%) à tetraciclina e, aos antibióticos de alta resistência, 3 (8,1%) à gentamicina e 4 (10,8%) à estreptomicina (Tabela 16). Dentre os antibióticos de alta resistência foi observada resistência em três (8,1%) isolados para gentamicina 120µg e em seis (16,2%) isolados para estreptomicina 300 µg (Gráfico 13). Valenzuela *et al.* (2008) observou diferentes perfis de resistência entre *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de alimentos. A maioria dos isolados de *E. faecalis* foi resistente à tetraciclina (86,95%), seguido de rifampicina (78,26%), ciprofloxacina (60,87%), nitrofurantoína (43,47%), levofloxacina (39,13%), eritromicina (21,73%), estreptomicina (17,39%), cloranfenicol (8,69%), vancomicina (8,69%) e teicoplanina (4,34%). *E. faecium* apresentou-se altamente resistente à nitrofurantoína (73,33%),

seguido de eritromicina (66,60%), ciprofloxacina (66,66%), levofloxacina (60,00%) e rifampicina (26,66%), vancomicina (6,66%) e teicoplanina (6,66%), estando a tetraciclina com uma baixa porcentagem (6,66%).

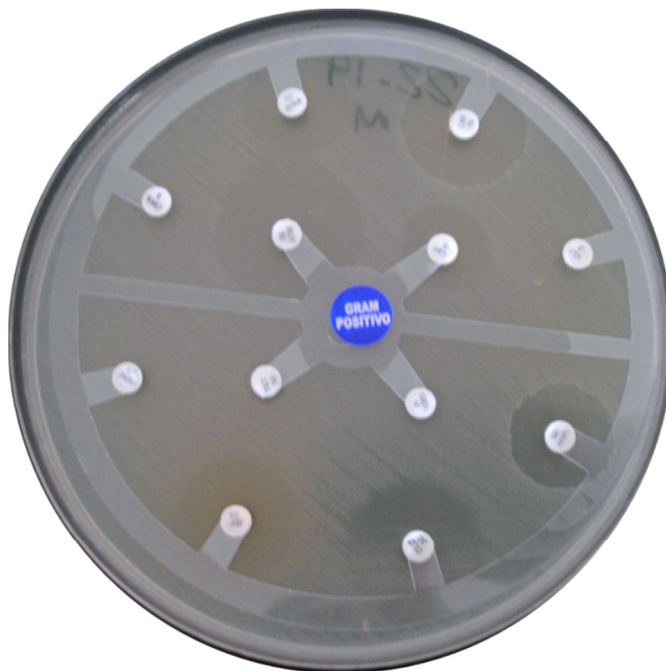


FIGURA 17 – EXEMPLO DE ANTIBIOGRAMA DO *Enterococcus* spp COM MULTIDISCO GRAM-POSITIVO

FONTE – O autor (2010)

TABELA 15 - FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE *Enterococcus* spp

Antibiótico	Concentração	Resistente		Sensibilidade Intermediária		Sensível	
		nº	%	nº	%	nº	%
Ciprofloxacina	5µg	4	10,8	10	27,0	23	62,2
Cloranfenicol	30µg	1	2,7	3	8,1	33	89,2
Eritromicina	15µg	17	45,9	12	32,4	8	21,6
Penicilina	10U	5	13,5	0	0,0	32	86,5
Rifampicina	5µg	13	35,1	6	16,2	18	48,6
Tetraciclina	30µg	16	43,2	1	2,7	20	54,1
Vancomicina	30µg	0	0,0	0	0,0	37	100,0
Ampicilina	10µg	0	0,0	0	0,0	37	100,0
Gentamicina	120µg	3	8,1	0	0,0	34	91,9
Estreptomicina	300µg	6	16,2	0	0,0	31	83,8

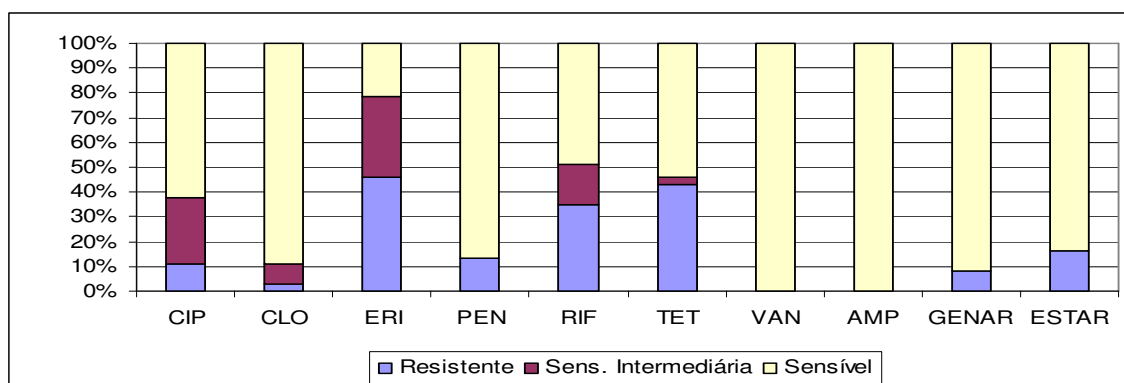


GRÁFICO 13 - FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE *Enterococcus* spp

LEGENDA: CIP – ciprofloxacina; CLO – cloranfenicol; ERI – eritromicina; PEN – penicilina, RIF – rifampicina, TET – tetraciclina, VAN – vancomicina; AMP – ampicilina; GENAR – gentamicina de alta resistência e ESTAR – estreptomicina de alta resistência

Ao avaliar a Tabela 16, onde se apresenta o perfil de resistência dos isolados de *E. faecalis*, não se observou diferença significativa para a frequência do gênero. *E. faecalis* apresentou-se mais resistente à tetraciclina (46,7%), seguido de eritromicina (36,7%), rifampicina (33,3%). Considerando a incidência de sensibilidade intermediária à eritromicina (36,7%), este antibiótico foi o que apresentou menor grau de sensibilidade a este antibiótico (26,7%).

TABELA 16 – FREQUÊNCIA DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS DE *E. faecalis*

Antibiótico	Concentração	Resistente		Sensibilidade Intermediária		Sensível	
		nº	%	nº	%	nº	%
Ciprofloxacina	5µg	3	10,0	8	26,7	19	63,3
Cloranfenicol	30µg	1	3,3	3	10,0	26	86,7
Eritromicina	15µg	11	36,7	11	36,7	8	26,7
Penicilina	10U	4	13,3	0	0,0	26	86,7
Rifampicina	5µg	10	33,3	6	20,0	14	46,7
Tetraciclina	30µg	14	46,7	1	3,3	15	50,0
Vancomicina	30µg	0	0,0	0	0,0	30	100,0
Ampicilina	10µg	0	0,0	0	0,0	30	100,0
Gentamicina	120µg	3	10,0	0	0,0	27	90,0
Estreptomicina	300µg	6	20,0	0	0,0	24	80,0

A eritromicina foi o antibiótico que apresentou mais resistência, e também o que apresentou maior diferença na proporcionalidade entre as espécies, sendo que nenhum dos isolados de *E. faecium* foi sensível. No caso do *E. faecalis*, 8 (26,7%)

foram sensíveis. E no caso de *E. casseliflavus* um (33,3%) dos três isolados foram sensíveis. Sapkota *et al.* (2007) observaram alto nível de resistência à eritromicina, clindamicina e tetraciclina em *Enterococcus* spp isolados de águas superficiais e profundas situadas em área de criação de suínos. Gomes (2007) avaliou o perfil de resistência de *E. faecalis* isolado a partir de amostras de leite, onde 72% foram resistentes a alta concentração de gentamicina (500µg/mL). Observou também resistência à vancomicina em 2% de *E. faecium* isolado de queijo e 3% isolado de produtos cárneos. Macovei e Zurek (2007) isolaram *Enterococcus* spp resistentes a partir de alimentos prontos para consumo (RTEF), durante o inverno 50,8% à tetraciclina, 13,8% ao ciprofloxacina e 4,6% à eritromicina e, durante o verão os isolados foram resistentes principalmente à tetraciclina (22,8%), eritromicina (22,1%) e canamicina (13,0%). Jindal *et al.* (2006) identificaram clortetraciclina e o macrolídeo tilosina como os antibióticos mais comumente usados para promoção de crescimento e profilaxia na suinocultura.

O uso de avoparcina, gentamicina e virginamicina para a promoção do crescimento e terapia em animais de produção têm levado ao surgimento de *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina, à gentamicina, e *E. faecium* resistentes à quinupristina / dalfopristina em animais e carne. Isso implica num risco potencial para transferência de genes de resistência ou de bactérias resistentes dos animais do alimento para os seres humanos (HAMMERUM; LESTER; HEUER, 2010).

Vilela *et al.* (2006) relataram resistência concomitante em amostras VRE de pacientes internados em um Hospital Universitário na cidade de Recife ao cloranfenicol, penicilina, eritromicina, teicoplanina, ciprofloxacina e tetraciclina. Todos os isolados foram sensíveis à ampicilina. Linezolid apresentou-se altamente eficiente contra todos os isolados. Conceição *et al.* (2010) avaliou dois isolados de VRE, em dois pacientes internados num hospital em Uberaba, Brasil, onde os mesmos foram resistentes a ciprofloxacina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e teicoplanina. Os isolados apresentaram suscetibilidade a ampicilina, penicilina, gentamicina e estreptomicina.

Guardabassi, Schwarz e Lloyd (2004) reportam dados sobre os animais de estimação e demonstraram que são claramente necessárias normas para orientar a política de uso de antimicrobianos em animais de pequeno porte na medicina veterinária, bem como para avaliar o risco de transmissão da resistência antimicrobiana para seres humanos. Rhadouani (2011) detectaram quatorze

isolados de *Enterococcus* spp contendo gene *vanA* a partir de 52 amostras de fezes de raposas em Portugal, sendo que nove foram *E. faecium* e cinco foram *E. durans*.

Tendo em vista que o aumento no uso de antimicrobianos leva ao aumento de resistência antimicrobiana, uso apropriado de antimicrobianos é a estratégia preeminente para limitar a resistência. (NICOLLE; CONLY; Mac DONALD, 2009).

4.9 CORRELAÇÃO DOS ISOLADOS DE *E. coli* e *Enterococcus* spp COM A POTABILIDADE DA ÁGUA E O POTENCIAL RISCO PATOGÊNICO DE CONSUMO POR SERES HUMANOS

Na Figura 18 estão ilustrados exemplos de fontes alternativas amostradas, situados no ponto de coleta 17 (Figura 18a), no ponto de coleta 23 (Figura 18b) e no ponto de coleta 29 (Figura 18c). Todos os três pontos ilustrados situam-se em Curitiba, Brasil. As fontes revelaram precariedade das condições higiênico-sanitárias acarretando um potencial risco patogênico.



FIGURA 18 – EXEMPLOS DE FONTES ALTERNATIVAS AMOSTRADAS
FONTE – O autor (2010)

A presença de indicadores de contaminação fecal, incluindo coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Enterococcus* spp, foi em 27 (69,2%) amostras, revelando potencial risco patogênico. Doenças por veiculação hídrica continuam a ocorrer em nações ricas. Nos Estados Unidos aproximadamente 45 milhões de pessoas usam água de poços particulares, vulnerável à contaminação e à qual é importante assegurar desinfecção adequada e manutenção apropriada. A suscetibilidade a surtos em sistemas particulares é similar na Europa e na América do Norte. A incidência de surtos entre consumidores de fontes particulares foi de até 35 vezes

maior do que entre consumidores de água fornecida por rede pública na Inglaterra e país de Gales entre 1992 a 2003 (JEFFREY, 2010).

A Tabela 17 apresenta os resultados de identificação bioquímica dos isolados, o perfil de resistência aos antibióticos, os fatores de virulência determinados fenotipicamente, os genes de virulência determinados genotipicamente e, a conclusão da potabilidade da água avaliada.

Este trabalho demonstrou que a pesquisa de *Enterococcus* spp na água, bem como a avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos, deve ter sua importância estabelecida vista à sua característica intrínseca de multirresistência. Em 10 (25,6%) amostras analisadas não foi isolada *E. coli*, no entanto apresentaram-se contaminadas por *Enterococcus* spp. Dentre os isolados de *Enterococcus* spp avaliados destes pontos considerados potáveis por parâmetros legais, 3 (8,1%) apresentaram resistência ao ciprofloxacina, 4 (10,8%) à eritromicina, 4 (10,8%) à rifampicina, 3 (8,1%) à tetraciclina e 1 (2,7%) aos antibióticos de alta resistência, gentamicina e estreptomicina.

TABELA 17 – CORRELAÇÃO POTABILIDADE DA ÁGUA Vs. POTENCIAL RISCO PATOGÊNICO

continua

P	Isolado	Identificação	Resistente a antibiótico	Sensibilidade Intermediária a antibiótico	Fatores de virulência	Gene de virulência	Potabilidade da água	Potencial risco patogênico (observação)
1	1	<i>E. faecium</i>	RIF	CIP, ERI	GC	Ace	Não	Sim
	2	<i>E. faecalis</i>	TET	ERI, RIF				
2	-	-					Sim	Sim (a)
3	3	<i>E. faecalis</i>	RIF	CIP	H		Não	Sim
4	-	-					Sim	Não
5	4	<i>E. coli</i>		CRX, MER			Sim	Sim (b)
6	-	-					Sim	Não
7	5	<i>E. coli</i>	CRX				Não	Sim
8	6	<i>E. faecalis</i>	ERI	RIF	C	Ace	Não	Sim
	7	<i>E. faecalis</i>	RIF	ERI	GC	Ace		
	8	<i>E. coli</i>	CFL, AMP					
	9	<i>E. coli</i>						
9	-	-					Sim	Não (c)
10	-	-					Sim	Não (c)

Continuação

P	Isolado	Identificação	Resistente a antibiótico	Sensibilidade Intermediária a antibiótico	Fatores de virulência	Gene de virulência	Potabilidade da água	Potencial risco patogênico (observação)
11	10	<i>E.faecium</i>	ERI		GC		Não	Sim
	11	<i>E. faecalis</i>	ERI,TET,GENAR,ESTAR	CIP	H			
	12	<i>E. coli</i>						
	13	<i>E. coli</i>						
12	-	-					Sim	Não (c)
13	-	-					Sim	Não (d)
14	-	-					Sim	Sim (a)
15	14	<i>E.faecium</i>	ERI		H		Não	Sim
	15	<i>E.faecium</i>	ERI		H			
	16	<i>E. coli</i>						
16	-	-					Sim	Sim (e)
17	17	<i>E. faecalis</i>	ERI,TET,GENAR,ESTAR		H		Sim	Sim
18	18	<i>E. faecalis</i>		ERI	GC		Não	Sim
	19	<i>E. faecalis</i>	TET	ERI	H			
19	-	-					Sim	Não
20	20	<i>E. faecalis</i>		ERI	GC		Não	Sim
	21	<i>E. faecalis</i>	CIP,ERI	CLO,RIF	G			
	22	<i>E. coli</i>						

Continuação

P	Isolado	Identificação	Resistente a antibiótico	Sensibilidade Intermediária a antibiótico	Fatores de virulência	Gene de virulência	Potabilidade da água	Potencial risco patogênico (observação)
	23	<i>E. coli</i>	MER,CAZ					
21	24	<i>E. faecalis</i>	ERI,RIF,TET,ESTAR	CIP,CLO			Não	Sim
	25	<i>E. faecalis</i>	ERI,RIF,TET,ESTAR	CIP,CLO	G			
22	26	<i>E. faecalis</i>	TET	CIP			Sim	Sim
23	-	-					Sim	Não (d)
24	-	-					Sim	Não (c)
25	27	<i>E. faecium</i>	ERI,RIF,TET	CIP	GCH		Não	Sim
	28	<i>E. casseliflavus</i>	CIP,ERI,PEN,RIF,TET					
	29	<i>E. coli</i>	AMP	AMC				
	30	<i>E. coli</i>		CRX				
26	-	-					Sim	Não
27	-	-					Sim	Não (d)
28	31	<i>E. faecalis</i>	TET		H		Não	Sim
	32	<i>E. coli</i>		CFL				
	33	<i>E. coli</i>						

Continuação

P	Isolado	Identificação	Resistente a antibiótico	Sensibilidade Intermediária a antibiótico	Fatores de virulência	Gene de virulência	Potabilidade da água	Potencial risco patogênico (observação)
29	34	<i>E. faecalis</i>	ERI,RIF,TET	CIP	CH	Ace	Não	Sim
	35	<i>E. faecalis</i>	CIP,ERI,PEN,RIF,TET					
	36	<i>E. coli</i>		MER				
	37	<i>E. coli</i>		MER				
30	38	<i>E. faecalis</i>	RIF		H		Não	Sim
31	39	<i>E. faecalis</i>	TET	ERI		Ace	Não	Sim
	40	<i>E. coli</i>		MER				
32	41	<i>E. faecalis</i>	ERI,PEN,RIF,TET	CIP	GC		Não	Sim
	42	<i>E. casseliflavus</i>	CIP,ERI,PEN,RIF,TET		GC	Ace		
	43	<i>E. coli</i>	AMC,SUT,AMP,MER	CRX,CFL				
	44	<i>E. coli</i>		CRX				
33	45	<i>E. faecalis</i>		ERI,RIF	GC	Ace	Não	Sim
	46	<i>E. casseliflavus</i>			GC			
	47	<i>E. coli</i>						
	48	<i>E. coli</i>						
34	49	<i>E. faecalis</i>		ERI	H		Não	Sim

Conclusão

P	Isolado	Identificação	Resistente a antibiótico	Sensibilidade Intermediária a antibiótico	Fatores de virulência	Gene de virulência	Potabilidade da água	Potencial risco patogênico (observação)
35	50	<i>E. faecalis</i>					Não	Sim
	51	<i>E. faecalis</i>	PEN,RIF,TET	CIP,ERI	GC	<i>Ace</i>		
36	52	<i>E. faecalis</i>	ERI	RIF	CH	<i>Ace</i>	Não	Sim
	53	<i>E. faecalis</i>		ERI	C	<i>Ace</i>		
	54	<i>E. coli</i>		CFL,MER				
37	-	-					Sim	Não (c)
38	55	<i>E. faecalis</i>			B		Não	Sim
	56	<i>E. faecalis</i>	GENAR,ESTAR		GC	<i>Ace</i>		
39	57	<i>E. faecalis</i>	CLO,ERI,ESTAR	RIF		<i>Ace</i>	Não	Sim
	58	<i>E. faecalis</i>		ERI,TET	GH	<i>Ace</i>		
	59	<i>E. coli</i>						

LEGENDA: AMC = amoxicilina/ácido clavulânico; CRX = cefuroxima; CFL = cefalotina; SUT = sulfazotrim; AMP = ampicilina; MER = meropenem; CAZ = ceftazidima; G = gelatinase; C = Caseinase; H = produção de hemolisina; B = beta lactamase; CIP = ciprofloxacina; CLO = cloranfenicol; ERI = eritromicina; PEN = penicilina, RIF = rifampicina, TET = tetraciclina, GENAR = gentamicina de alta resistência; ESTAR = estreptomicina de alta resistência, *ace* = gene de aderência; (a) Por apresentar *Enterococcus* spp; (b) por apresentar *E. coli* isolado em meio Cromoclin US; (c) necessita investigação posterior por apresentar bactérias termotolerantes com atividade enzimática; (d) necessita investigação posterior por apresentar bactérias termotolerantes com atividade enzimática e coliformes totais; (e) necessita investigação posterior por apresentar bactérias termotolerantes com atividade enzimática, *Enterococcus* spp e coliformes totais.

O potencial risco patogênico de consumo de água de fontes alternativas, sem desinfecção prévia foi revelado através da incidência de 21 amostras de água não potáveis. Este risco foi enaltecido pela presença de bactérias em 14 amostras onde não houve presença de indicadores de potabilidade *E.coli* e/ou coliformes termotolerantes, distribuídas conforme apresentado no Gráfico 14. Somente 4 amostras consideradas potáveis não apresentaram outros indicadores bacterianos avaliados.

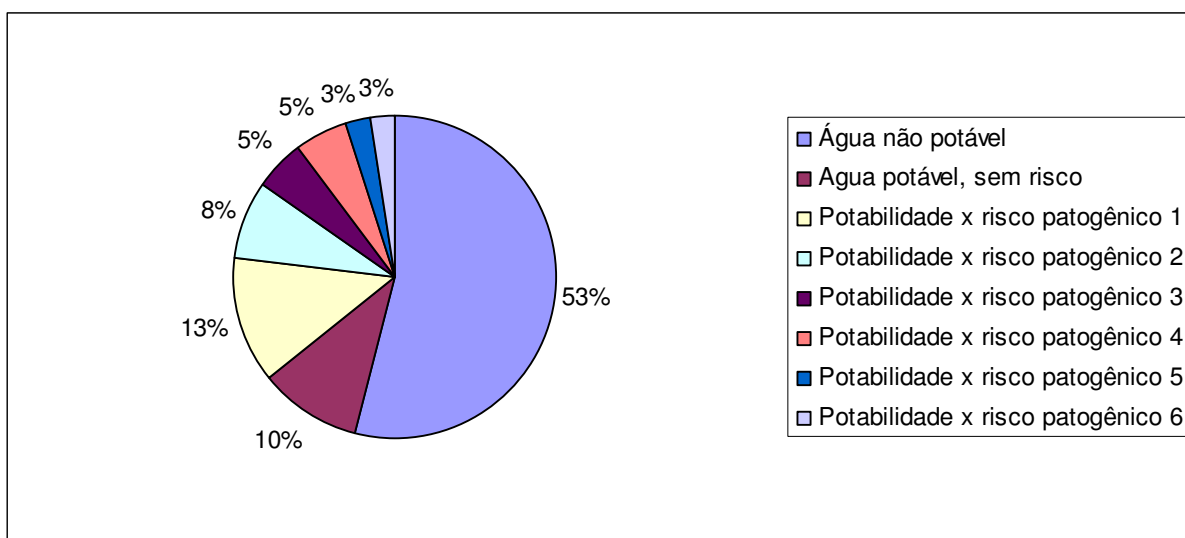


GRÁFICO 14 – CORRELAÇÃO DE POTABILIDADE Vs. POTENCIAL RISCO PATOGÊNICO

LEGENDA: Potabilidade x risco patogênico 1 – necessita investigação posterior por apresentar bactérias termotolerantes com atividade enzimática; Potabilidade x risco patogênico 2 – necessita investigação posterior por apresentar bactérias termotolerantes com atividade enzimática e coliformes totais; Potabilidade x risco patogênico 3 – água potável, com fatores de virulência/resistência a antibióticos para *Enterococcus* spp; Potabilidade x risco patogênico 4 – água potável, presença de *Enterococcus* spp; Potabilidade x risco patogênico 5 – por apresentar *E. coli* isolado em meio Cromoclin US; Potabilidade x risco patogênico 6 – necessita investigação posterior por apresentar bactérias termotolerantes com atividade enzimática, *Enterococcus* spp e coliformes totais.

Dentre os isolados que apresentaram resistência a antibióticos alguns também possuíram algum fator de virulência (Tabela 18), no entanto, assim como Rosas *et al.* (2006) havia observado, este trabalho demonstrou não haver correlação nos resultados entre resistência aos antibióticos e fatores de virulência. Segundo Valenzuela *et al.* (2008), a alta abundância de isolados carregando fatores de virulência e resistência a antibióticos, sugere que a qualidade sanitária de alimentos deve ser melhorada diminuindo a incidência de *Enterococcus* spp.

TABELA 18 - CORRELAÇÃO ENTRE SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS, FATORES DE VIRULÊNCIA E GENE DE VIRULÊNCIA ENTRE OS ISOLADOS DE *Enterococcus* spp

Continua

Antibiótico, fator de virulência	Percentual de isolados (nº produzindo fator de virulência/total)		
	R	I	S
Ciprofloxacina			
produção de gelatinase	13,3(2/15)	33,3(5/15)	53,3(8/15)
produção de caseinase	6,3(1/16)	31,3(5/16)	62,5(10/16)
produção de hemolisina	0	30,8(4/13)	69,2(9/13)
presença de ace	7,7(1/13)	23,1(3/13)	69,2(9/13)
Cloranfenicol			
produção de gelatinase	0	13,3(2/15)	86,7(13/15)
produção de caseinase	0	0	100,0(16/16)
produção de hemolisina	0	0	100,0(13/13)
presença de ace	7,7(1/13)	0	92,3(12/13)
Eritromicina			
produção de gelatinase	40,0(6/15)	46,7(7/15)	13,3(2/15)
produção de caseinase	43,8(7/16)	43,8(7/16)	12,4(2/16)
produção de hemolisina	53,9(7/13)	23,1(3/13)	23,1(3/13)
presença de ace	38,5(5/13)	53,9(7/13)	7,7(1/13)
Penicilina			
produção de gelatinase	20,0(3/15)	0	80,0(12/15)
produção de caseinase	18,7(3/16)	0	81,3(13/16)
produção de hemolisina	0	0	100,0(13/13)
presença de ace	15,4(2/13)	0	84,6(11/13)
Rifampicina			
produção de gelatinase	46,7(7/15)	13,3(2/15)	40,0(6/15)
produção de caseinase	43,8(7/16)	18,8(3/16)	37,4(10/16)
produção de hemolisina	30,8(4/13)	7,7(1/13)	61,5(8/13)
presença de ace	38,5(5/13)	30,8(4/13)	30,8(4/13)
Tetraciclina			
produção de gelatinase	33,3(5/15)	6,7(1/15)	40,0(6/15)
produção de caseinase	31,3(5/16)	0	68,7(11/16)
produção de hemolisina	46,2(6/13)	7,6(1/13)	46,2(6/13)
presença de ace	30,8(4/13)	7,7(1/13)	61,5(8/13)
Gentamicina			
produção de gelatinase	6,7(1/15)	0	93,3(14/15)
produção de caseinase	6,3(1/16)	0	93,8(15/16)
produção de hemolisina	15,4(2/13)	0	84,6(11/13)
presença de ace	7,7(1/13)	0	92,3(12/13)

Antibiótico, fator de virulência	Conclusão		
	Percentual de isolados (nº produzindo fator de virulência/total)		
	R	I	S
Estreptomicina			
produção de gelatinase	13,3(2/15)	0	86,7(13/15)
produção de caseinase	6,3(1/16)	0	93,8(15/16)
produção de hemolisina	15,4(2/13)	0	84,6(11/13)
presença de ace	15,4(2/13)	0	84,6(11/13)

Houve 47 (78,3%) isolados resistentes e/ou com sensibilidade intermediária a antibióticos e, incidência de fatores de virulência em 44 (73,3%) isolados e detecção de genes de virulência em 13 (21,7%) isolados. Dentre os 60 isolados somente três (2%) não apresentaram fatores de virulência, genes de virulência e foram sensíveis aos antibióticos avaliados (isolados 50, 59 e 60) (Tabela 19). Cabe ressaltar que o isolado 51, do mesmo ponto do 50 e, os isolados 57 e 58, do mesmo ponto do 59 e 60 apresentaram fatores de virulência e/ou resistência a antibióticos.

TABELA 19 - INCIDÊNCIA DE ISOLADOS RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICO, FATORES DE VIRULÊNCIA E GENES DE VIRULÊNCIA

	Total de isolados	resistência a antibiótico (R+I)	Fatores de virulência	Gene de virulência
<i>E. coli</i>	23	13 (56,5%)	15 (65,2%)	0
<i>E. faecalis</i>	29	27 (93,1%)	22 (75,9%)	11 (38%)
<i>E. casseliflavus</i>	3	2 (66,7%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)
<i>E. faecium</i>	5	5 (100%)	5 (100%)	1 (20%)
Total	60	47 (78,3%)	44 (73,3%)	13 (21,7%)

O potencial risco patogênico também foi evidenciado por Murakami e Sá (2010a, não publicado), (2010b, não publicado) que realizaram entrevista com os moradores da Chácara Dr. Mário Jorge, pontos 26, 28, 30, 31 e 32. Todos os entrevistados responderam que preparam os alimentos com a água de fonte alternativa e 60% ingerem. 60% dos entrevistados responderam não possuírem conhecimento sobre o risco de ingerir água imprópria para consumo. 80% reportaram que têm ocorrido casos de diarreia na família. Ao avaliar o destino do esgoto, 40% responderam não darem destino adequado ao esgoto, 40% criam

animais na propriedade e 100% jogam na pia ou no lixo as medicações que sobram ou vencem.

Estudos relatam que para cada dólar investido em saneamento pode-se economizar quatro dólares em sistema de saúde. Mostram ainda que, no Brasil, 65% das internações hospitalares poderiam ser evitadas caso o país apresentasse adequada estrutura de saneamento (STARLING *et al.*, 2005).

6 CONCLUSÕES

- Águas de fontes alternativas estão sendo utilizadas na cidade de Curitiba e Região Metropolitana sem desinfecção prévia por cloro livre.
- O método do substrato cromogênico para quantificação de coliformes totais detectou uma maior positividade quando comparado ao método de tubos múltiplos através do caldo lauril sulfato triptose, correlacionando com a revisão de literatura onde aponta maior incidência de bactérias com atividade beta-galactosidásica do que fermentadoras de lactose. A avaliação estatística não demonstrou diferença significativa nos resultados.
- Coliformes termotolerantes e *E. coli* foram isolados de amostras de águas de fontes alternativas, no entanto ocorreram amostras com ausência destes indicadores preconizados pela legislação brasileira e presença de *Enterococcus* spp, sugerindo-se a inclusão deste como indicador de contaminação fecal em amostras de água de consumo em fontes alternativas como minas e poços.
- O método da membrana filtrante utilizando-se ágar m-enterococcus para quantificação de *Enterococcus* spp detectou uma maior positividade do que quando usado o ágar m-EI, porém a avaliação estatística não demonstrou diferença significativa nos resultados.
- O método do substrato cromogênico para quantificação bactérias termotolerantes com atividade enzimática poderia ser proposto como método alternativo para triagem de bactérias indicadoras, trazendo como benefícios a facilidade de uso com baixo custo, não necessitando de recursos elevados para análise laboratorial.

- O caldo Aquateste coli® apresentou desvio positivo e consequentemente especificidade relativa positiva quando comparada ao método convencional, trazendo como benefícios a facilidade de uso com rapidez nos resultados, não necessitando de recursos elevados e inclusão de análises complementares para identificação de *E. coli*.
- Embora a análise estatística dos dados não demonstrasse diferença significativa, nenhum dos dois métodos avaliados para pesquisa de *Enterococcus* spp apresentou total sensibilidade e especificidade onde se evidenciaram desvios negativos e positivos em ambos.
- Embora *E. coli* clássica, enteroinvasora e enterohemorrágica não tenham sido isoladas de água de fontes alternativas, houveram isolados multirresistentes a antimicrobianos.
- *Enterococcus* spp carreando fatores de virulência como gelatinase, caseinase e hemolisina, bem como genes de virulência estão sendo veiculados através de água de fontes alternativas.
- Apesar de não terem sido detectados VRE, *Enterococcus* spp multidroga resistentes estão sendo veiculados através da água de fontes alternativas.
- Águas provenientes de fontes alternativas em áreas urbanas como fontes em parques e bosques, minas e poços, utilizadas sem tratamento, trazem potencial risco patogênico, veiculando *Enterococcus* spp em águas consideradas potáveis pelos parâmetros legais.
- O presente trabalho demonstrou que *E. coli* e *Enterococcus* spp desempenham não somente papel de indicador de contaminação fecal, bem como apresentam potencial risco patogênico, apresentando resistência a antibióticos e/ou fatores de virulência.

6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Pesquisar *Enterococcus* spp bem como seus fatores de virulência e avaliar o perfil de resistência aos antibióticos em isolados de água bruta de estação de tratamento de água, isolados de lodo de esgoto de estação de tratamento de esgoto ou isolados de alimentos de origem animal ou vegetal onde tenha sido produzido com reaproveitamento de fezes animais e/ou lodo de esgoto.
- Pesquisar *Enterococcus* spp bem como os fatores de virulência e avaliar o perfil de resistência aos antibióticos em isolados de swab anal e urina de pacientes idosos que permanecem em áreas concentradas como casas de repouso ou asilos.
- Verificação dos genes de resistência presentes em *E. coli*, principalmente nos isolados apresentando resistência ao meropenem.
- Pesquisar fatores de virulência e avaliar o perfil de resistência aos antibióticos em isolados de *E. coli* e *Enterococcus* spp de água mineral.
- Pesquisar fatores de virulência em isolados de *E. coli* de alimentos em geral.

REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H.; OMAR, N. B.; MOLINOS, A. C.; LÓPEZ, R. L.; GRANDE, M. J.; MARTÍNEZ-VIDMA, P.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M. M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, n. 1-2, p. 38–49, Mar. 2008.
- ANDRADE, C. M. A.; GOMES, C. T. S.; ARAGÃO, N. K. C. V.; SILVA, E. M.; LIRA, G. A.S. T. Estrutura da comunidade fitoplanctônica com ênfase em cianobactéria no reservatório de Tapacurá-PE. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, abr. 2009. Disponível em <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php>. Acesso em 15/06/2011.
- ANDRAUS, S. **Aspectos microbiológicos da qualidade sanitária das águas do mar e areias das praias de Matinhos, Caiobá e Guaratuba-PR**. 124 p. Dissertação (grau de Mestre em Ciência do Solo) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- ARCHIMBAUD, C.; SHANKAR, N.; FORESTIER, C.; BAGHDAYAN, A.; GILMORE, M.S.; CHARBONNÉ, F.; JOLY, B. *In vitro* adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. **Research in Microbiology**, Paris, v. 153, p. 75-80, Mar. 2002.
- ARIAS, C. A.; CONTRERAS, G. A.; MURRAY, B. E. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 556-562, June 2010.
- BARON, S. **Medical Microbiology**. 4. Ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- BEUX, M. R.; YAMANAKA, E. H. U.; MONTEIRO, C. L. B. M.; FÁVARO, C.; WAKAMORI, M.; COGO, L. L. Análise comparativa entre o método do substrato cromogênico “Aquateste Coli®” e o método de fermentação da lactose na pesquisa de coliformes em água de consumo humano. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOPROCESSOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS, 4, 2010, Curitiba. **Resumos do ICBF 2010 / X ERSCTA**, Curitiba: 2010. 1 CD-ROM.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria n. 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 de março de 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde, ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC n. 275, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 22 de dezembro de 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde, ANVISA. Gerenciamento dos Resíduos de Mercúrio nos Serviços de Saúde / Ministério do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 46 p., 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Surto de SHU causada por cepa rara de *E.coli* sorotipo 0104 na Europa. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>. Acesso em 08/06/2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Situação da Cólera no Brasil. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/paf/viajantes/colera.htm#8>. Acesso em 08/06/2011.

BRUEGGEMANN, A. B. Antibiotic resistance mechanisms among pediatric respiratory and enteric pathogens: A current update **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Texas, v. 25, n. 10, p.969-73, Oct. 2006.

BYARUGABA, D. K. Mechanisms of Antimicrobial Resistance. In: SOSA, A. J., BYARUGABA, D. K., AMÁBILE-CUEVAS, C. F., HSUEH, P. R.; KARIUKI, S.; OKEKE, I. N. **Antimicrobial Resistance in Developing Countries**. London: Springer, 2010, p. 15-26.

CAMARGO, I. L. L. B. C.; DARINI, A. L. C. **Estudo dos fatores de virulência em *Enterococcus* spp Isolados no Brasil**. 153f. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CAMARGO, I. L. B. C.; ZANELLA, R. C.; GILMORE, M. S.; DARINI, A. L. C. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin – susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 273-278, 2008.

CANTUSIO NETO, R.; SANTOS, L. U.; FRANCO, R. M. B. Água: escassez e qualidade. **Higiene Alimentar**, v. 22, p. 3-4, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th Informational Supplement M100-S20, Wayne, PA. 2010.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 66, n. 10, p. 4555–4558, Oct. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 24/10/2009.

COLEMAN, B. L. **The role of drinking water as a source of transmission of antimicrobial resistant *Escherichia Coli***. Tese (grau de doutor em Filosofia) – Department of Public Health Sciences, University of Toronto, Toronto, 2008. Disponível em: <http://tspace.library.utoronto.ca>. Acesso em: 2/11/2010.

CONCEIÇÃO, N.; DARINI, A. L. C.; PALAZZO, I. C. V.; OLIVEIRA, C. C. H. B.; OLIVEIRA, A. G. First case of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Uberaba, Minas Gerais state. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.41, n. 1, Jan./Mar. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br>. Acesso em: 27/03/2011.

COORDENAÇÃO DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA. Ocupação da RMC. Disponível em <http://www.comec.pr.gov.br>. Acesso em 10/06/2011.

CREMNITER, J.; MAINARDI, J.; JOSSEAUME, N.; QUINCAMPOIX, J.; DUBOST, L.; HUGONNET, J.; MARIE, A.; GUTMANN, L.; RICE, B. R.; ARTHUR, M. Novel mechanism of resistance to glycopeptide antibiotics in *Enterococcus faecium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 43, p. 32254–32262, 2006. Disponível em: <http://www.jbc.org>. Acesso em: 24.10.2009.

CURITIBA. Parques e bosques de Curitiba. Disponível em <http://www.curitiba.pr.gov.br/secretarias>. Acesso em 14/11/2009.

DALLA COSTA, L. M.; SOUZA, D. C.; MARTINS, L. T. F.; ZANELLA, R. C.; BRANDILEONE, M. C.; BOKERMANN, S.; SADER, H. S.; SOUZA, H. A. P. H. M. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 2, n. 3, p.160-3, 1998. Disponível em: <http://bases.bireme.br>. Acesso em 9/3/2011.

DOMIG, K. J.; MAYER H. K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. Media for isolation an enumeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 147-164, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 24/11/2010.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; RICE E. W., GREENBERG A. E. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21th ed. Washington: American Public Health Association, 2005.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1628-1635, 2001.

FACKLAM, R.; ELLIOTT, J.; PIGOTT, N.; FRANKLIN, A.R. Identification of *Streptococcus porcinus* from human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 385-388, Feb. 1995.

FARAH, S. M. S. S. **Características fenotípicas e genotípicas de estirpes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no estado do Paraná**. 77 p. Dissertação (grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em: < <http://dspace.c3sl.ufpr.br>. Acesso em: 2/11/2009.

FARREL, N. R. The landscape of antibiotic resistance. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 6, p.245-250, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 27.01.2011.

FIALHO, O. B. **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreiogênicas por PCR-Multiplex**. 106 p. Dissertação (grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FILIPOVÁ, M.; BUJDÁKOVÁ, H. Factors of virulence and mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* with high-level gentamicin resistance. **Epidemiologie, Mikrobiologie Immunologie**, v. 54, n. 2, p. 65-74, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FRANZ, C. M.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; YOUSIF, N. M.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 67, n. 9, p. 4385-9, 2001.

FRANZ, C. M.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.105–122, 2003.

FURUMURA, M. T; FIGUEIREDO, P. M. S; CARBONELLI, G. V.; DARINI, A. L. C; YANO, T. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 230-236, 2006.

GARCIA-MIGURA, L.; LIEBANA, E.; JENSEN, L. B. Transposon characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) and dissemination of resistance associated with transferable plasmids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 263–268, 2007. Disponível em: <jac.oxfordjournals.org>. Acesso em 13.03.2011.

GELLI, D. S. **Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – DTHA**. Apostila de curso de Especialização em Qualidade de Alimentos. CBES, Curitiba. 2001.

GEROLOMO, M. PENNA, M. L. F. Os primeiros cinco anos da sétima pandemia de cólera no Brasil. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v. 8, n. 3, set. 1999. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br>. Acesso em 15/06/2011.

GOMES, B. C. **Enterococos em amostras de alimentos e águas: avaliação da virulência e do desempenho como indicadores de higiene**. 167 p. Dissertação (grau de Doutorem Ciências de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em <www.teses.usp.br/teses>. Acesso em 24.11.2010.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D. H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 321–332, 2004.

GUION, C. A.; OCHOA, T. J.; WALKER, C. M.; BARLETTA, F.; CLEARY, T. G. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 46, n. 5, p. 1752-1757, 2008.

GUTSCHIK E.; MOLLER S.; CHRISTENSEN, N. Experimental endocarditis in rabbits. 3. Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 87, p.353–362, 1979.

HAMELIN, K.; BRUANT, G.; EL-SHAARAWI, A.; HILL, S.; EDGE, T. A.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J. E.; MAYNARD, C.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 73, n. 2, p. 477–484, 2007.

HAMMERUM, A. M.; LESTER, C. H.; HEUER, O. E. Antimicrobial-Resistant Enterococci in animals and meat: A human health hazard? **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1137-1146, Oct. 2010.

HIGGINS, J. A.; BELT, K. T.; KARNS, J. S.; ANELLI, J. R.; SHELTON, D. R. tir- and stx-Positive *Escherichia coli* in stream waters in a metropolitan area. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 71, n. 5, p. 2511-2519, 2005.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th Ed. New. York: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

HUNTER, P.R. Drinking water and diarrhoeal disease due to *Escherichia coli*. **Journal of Water Health**, v. 1, n. 2, p. 65-72, 2003. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em 10/11/2009.

HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 418, p.781–784, 1997.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. **ISO 16140**: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. 2003.

JEFFREY, W. A. Private drinking water supplies: challenges for public health. **Journal of Canadian Medical Association**, vol. 182, n. 10, p. 1061-1064, 2010.

JINDAL, A.; KOCHERGINSKAYA, S.; MEHBOOB, A.; ROBERT M.; MACKIE, R.; RASKIN, L.; ZILLES, J. L. Antimicrobial Use and Resistance in Swine Waste Treatment Systems. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 72, n. 12, p. 7813–7820, 2006.

JOHNSON, J. R.; OWENS, K. L.; CLABOTS, C. R.; WEISSMAN, S. J.; CANON, S. B. Phylogenetic relationships among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus sequence analysis. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1702-1713, 2006.

KAMPFER, P.; NIENHUSER, A.; PACKROFF, G.; WERNICKE, F.; MEHLING, A.; NIXDORF, K.; FIEDLER, S.; KOLAUCH, C. ESSER, M.. Molecular Identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 211, p. 374-384, 2008.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KARIUKI, S. Antimicrobial resistance in enteric pathogens in developing countries. In: SOSA, A. J.; BYARUGABA, D. K.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F.; HSUEH, P. R.; KARIUKI, S.; OKEKE, I. N. **Antimicrobial resistance in developing countries**. London: Springer, 2010, p. 177-197.

KREFT, B.; MARRE, R.; SCHRAMM, U.; WIRTH, R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. **Infection and Immunity**, v. 60, p.25–30, 1992.

LEAVIS, H.; TOP, J.; SHANKAR, N.; BORGEM, K.; BONTEN, M.; EMBDEN, J.; WILLEMS, R. J. L. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. **Journal of Bacteriology**, Washington DC, v. 186, p. 672-682, 2004. Disponível em: <http://jb.asm.org>. Acesso em: 21/4/2009.

LEE, S. H.; LEVY, D. A.; CRAUN, G. F.; BEACH, M. J.; CALDERON, R. L. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000. **MMWR. Surveillance summaries**, v. 51, n. 8, p. 1-47, Nov. 2002. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/ss/ss5108.pdf>. Acesso em 15/10/2011.

LENCH, N.; STAINER, P.; WILLIAMSON, R. Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. **Lancet**, i:1356-8, 1988.

LOPEZ-SAUCEDO, C.; CERNA, J. F.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUEZ, F. R.; TORRES, J. TARR, P. I.; ESTRADA-GARCIA, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p.127–131, 2003.

MACOVEI, L.; ZUREK, L. Influx of Enterococci and associated antibiotic resistance and virulence genes from ready-to-eat food to the human digestive tract. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 73, n. 21, p. 6740–6747, 2007.

MANAFI, M.; KNEIFEL, W.; BASCOMB, S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 335-348, Sept. 1991.

MANAFI, M. New approaches for the fast detection of indicators, in particular enzyme detection methods (EDM). **Interlaken**, 1998.

MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRÈ, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 291-304, 2003.

MARQUES, F. P. P.; PASCHOAL, D. N. R.; PATRÍCIO, C. C. F.; ARAÚJO, L. R.; CAMPOS, M. R. H. Qualidade microbiológica da água proveniente de poços artesianos em unidades de alimentação e nutrição da cidade de Goiânia (GO): Análise de laudos laboratoriais constantes na divisão de saneamento da vigilância sanitária municipal. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v 22, p. 3-4, 2008.

MARTINS-VIEIRA, M. B. C.; BRITO, L. A. L.; HELLER, L. Oocistos de *Cryptosporidium parvum* em fezes de bezerro infectado experimentalmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 6, dez. 2009.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

MURAKAMI, A. M. U.; SÁ, A. A. **A importância da sensibilização para atenuar os problemas gerados pelo consumo de água contaminada em uma comunidade rural no bairro CIC em Curitiba**. Curitiba, 2010^a. Não publicado.

MURAKAMI, A. M. U.; SÁ, A. A. **Levantamento da problemática do consumo de água em uma comunidade rural no bairro CIC em Curitiba**. Curitiba, 2010b. Não publicado.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9. Ed. Washington D. C.: ASM Press. 2007.

NALLAPAREDDY, S. R.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediate by Acm, a new member of the MSCRAMM family. **Molecular Microbiology**, v. 47, p. 1733-1747, 2003.

NICOLLE, L.; CONLY, J. M.; MacDONALD, N. Embracing ecology to limit antimicrobial resistance. **Journal of Canadian Medical Association**, v. 17, p. 180-184, 2009

NOGUEIRA, K. S.; HIGUTI, I. H.; NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA, L. B.; OLIVEIRA, S. ; MATOS, A. P.; SOUZA, H. A. P. H. M.; COGO, L. L.; DALLA COSTA, L. M. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, 137outhern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10(6), p. 390-395, 2006.

OKEKE, I. N. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 11, p. 817-42, Nov. 2009.

OLIVEIRA, D.G.S. **Potabilidade da água de fontes alternativas (nascente, poço raso e poço profundo) na zona rural de Formiga (MG) e sua relação com a condição ambiental da microbacia**. 55p. Dissertação (grau de Mestre em Educação, Cultura e Organizações Sociais) – campus da Fundação Educacional de Divinópolis, Universidade do Estado de Minas Gerais, Divinópolis, 2008.

ORSI, R. H.; STOPPE, N. C.; SATO, M. I.; PRADO, P. I.; OTTOBONI, L. M. Identification of *Escherichia coli* from groups A, B1, B2 and D in drinking water in Brazil. **Journal of Water Health**, v. 5, n. 2, p. 323-7, 2007.

ORSI, R. H.; STOPPE, N. C.; SATO, M. I. Z.; PRADO, P. I.; OTTOBONI, L. M. M. Phylogenetic group distribution among *Escherichia coli* isolated from rivers in São Paulo State, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1573-1577, 2008.

PALAZZO, I. C. V.; CAMARGO, I. L. B. C.; ZANELLA, R. C.; DARINI, A. L. C. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546-like elements associated with *vanA* plasmids. **FEMS Microbiology Letter**, v. 258, p. 29-36, 2006.

PARANÁ, Secretaria do Estado da Saúde. Casos de doenças por veiculação hídrica. 2011.

PATOLI, A. A.; PATOLI, B. B.; MEHRAJ, V. High prevalence of multi-drug resistant *Escherichia coli* in drinking water samples from Hyderabad. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. 1, jan-jun 2010. Disponível em: <http://www.gjms.com.pk> Acesso em 26/03/2010.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. **Microbiologia** : Conceitos e Aplicações. V. 2, 2. Ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

PNUD – PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO. Disponível em <http://www.pnud.org.br/saneamento/reportagens>. Acesso em 26/10/2009.

PUPO, G. M.; KARAOLIS, D. K. R.; LAN, R.; REEVES, P. R. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2685-2692, 1997.

RAKITA, R. M.; VANEK, N. N.; JACQUES-PALAZ, K. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 6067–6075, 1999.

RHADOUANI, H.; IGREJAS, G.; CARVALHO, C.; PINTO, L.; GONÇALVES, A.; LOPEZ, M.; SARGO, R.; CARDOSO, L.; MARTINHO, A.; REGO, V.; RODRIGUES, R.; TORRES, C.; POETA, P. Clonal Lineages, Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated from Fecal Samples of Red Foxes (*Vulpes Vulpes*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 3, p. 769-773, Jul. 2011.

RIBAS, R. M.; DARINI, A. L. C.; MOREIRA, T. A.; FREITAS, C.; GONTIJO FILHO, P. P. Vancomycin-resistant *van a* phenotype *Enterococcus faecalis*: first case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 11, n. 4, p. 439-440, Aug. 2007.

ROSAS, I.; SALINAS, E.; MARTINEZ, L.; CALVA, E.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C.; AMABILE-CUEVAS, C. F. Urban dust fecal pollution in Mexico City: Antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli*. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.209, n. 5, p. 461-470, 2006.

ROSENBERG, F. A. The microbiology of bottled water. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 25, n. 6, p. 41-44, 2003.

SAHM, D. F.; KISSINGER, J.; GILMORE, M. S.; MURRAY, P. R.; MULDER, R.; SOLLIDAY, J.; CLARKE, B. In vitro susceptibility studies of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, p. 1588–1591, 1989.

SAID, B.; WRIGHT, F.; NICHOLS, G. L.; REACHER, M.; RUTTER, M. Outbreaks of infectious disease associated with private drinking water supplies in England and Wales 1970-2000. **Epidemiology and Infection**, v. 130, n. 3, p. 469-79, 2003.

SALHSTROM, L.; REHBINDER, V.; ALBIHN, A.; ASPAN, A.; BENGTSSON, B. Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish sewage sludge. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 24, 2009.

SÃO PAULO, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. CVE – SES – SP. *Escherichia coli* O157:H7 – enterohemorrágica (EHEC). **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água**. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em 08/06/2011.

SAPKOTA, A. M.; CURRIERO, F. C.; GIBSON, K. E.; SCHWAB, K. J. Antibiotic-resistant Enterococci and fecal indicators in surface water and groundwater impacted by a concentrated swine feeding operation. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 7, p.1040-1045, 2007.

SAVA, I. G; ZHANG, F.; TOMA, I.; THEILACKER, C.; LI, B; BAUMERT, T. F.; HOLST, O.; LINHARDT, R. J.; HUEBNER, J. Novel interactions of glycosaminoglycans and bacterial glycolipids mediate binding of Enterococci to human cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 27, p. 18194–18201, 2009.

SCHETS, F. M.; NOBEL, P. J.; STRATING, S.; MOOJIMAN, K. A.; ENGELS, G. B.; BROUWER, A. EU Drinking Water Directive reference methods for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* compared with alternative methods. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 227-231, 2002.

SETHABUTR, O.; VENKATESAN, M.; MURPHY, G. S.; EAMPOKALAP, B.; HOGE, C. W.; ECHEVERRIA, P. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 458–461, 1993.

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A. S.; HUYCKE, M. M.; LINDAHL, G.; GILMORE, M. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v.67, p.193-200, 1999.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Editora Varela, 2010.

SILVA, N.; CANTUSIO NETO, R.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A **Manual de métodos de análise microbiológica de água**. São Paulo: Editora Varela, 2005.

SINGH, K. V.; SREEDHAR, R.; NALLAPAREDDY, S. R.; JOUKO SILLANPÄÄ, J.; MURRAY, B. E. Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. **PloS Pathogens**, v. 6, n. 1, 2010.

SILVA, C. H. P. M. Beta-lactamase de espectro estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 32, n. 3, p. 215-9, 2000.

SLOAT, S.; ZIEL, C. **The use of indicator organisms to assess public water safety**. Hach Company, Loveland, CO, 1992.

SOTO, S. M.; BOSCH, J.; JIMENEZ de ANTA, M. T.; VILA, J. Comparative study of virulence traits of *Escherichia coli* clinical isolates causing early and late neonatal sepsis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 46, n. 3, p. 1123-1125, 2008.

STARLING, F. A.; KUTIAISKI, G. F. R.; SOUSA, G. M.; MACHADO, G. M.; TAVARES, W. N.; CARREIRA, W. Influência do Saneamento Básico na Saúde Pública de Grandes Cidades. **Escola Politécnica da USP**, nov. 2005.

SU, Y. A.; SULAVIK, M. C.; HE, P.; MAKINEN, K. K.; MAKINEN, P. L.; FIEDLER, S.; WIRTH, R.; CLEWELL, D. B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infectious and Immunity**, v. 59, p. 415-20, 1991.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do penumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba**, v. 33, n. 3, p. 281-301, mai-jun, 2000.

TEBBUTT, T. H. Y. **Principles of water quality control**. 5. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 280 p, 1998.

TEIXEIRA, M. G.; COSTA, M. C.; CARVALHO, V. L.; PEREIRA, M. S.; HAGE, E. Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica Dam, Bahia, Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 27, n. 3, p. 244-53, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em 15/06/2011.

TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N.; NAKASONE, N.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 41, p. 2669–2671. 2003.

VALENZUELA, A. S.; OMAR, N. B.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ R. L.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M. M.; GÁLVEZ, A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2648-2652, Aug. 2008.

VERGIS, E. N.; SHANKAR, N.; CHOW, J. W.; HAYDEN, M. K.; SNYDMAN, D. R.; ZERVOS, M. J.; LINDEN, P. K.; WAGENER, M. M.; MUDER, R. R. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 570-575, 2002.

VILELA, M. A.; SOUZA, S. L.; PALAZZO, I. C. V.; FERREIRA, J. C.; MORAIS JÚNIOR, M. A.; DARINI, A. L. C.; MORAIS, M. M. C. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Northeast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n. 7, p. 715-719, nov. 2006.

WANG, G.; CLARK, C. G.; RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington D.C., v. 40, p. 3613–3619, 2002.

WELLS, C. L.; JUNI, B. A.; CAMERON S. B.; MASON K. R.; DUNN D. L.; FERRIERI, P.; RHAME F. S. Stool carriage, clinical isolation, and mortality during an outbreak of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized medical and/or surgical patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p.45–50, 1994.

WERNER, G.; FREITAS, A. R.; COQUE, T. M.; SOLLID, J. E.; LESTER, C.; HAMMERUM, A.; GARCIA-MIGURA, L.; JENSEN, L.; FRANCA, M. V.; WITTE, W.; WILLEMS, R. J.; SUNDSFJORD, A. Host range of enterococcal *vanA* plasmids among Gram-positive intestinal bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. 273-282, 2011.

WINN, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: Antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 3, p. 2–21, May 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality**. First addendum to third edition. v. 1. Recommendations. 3. ed. 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Use of improved drinking water sources. **Global Health Observatory (GHO)**. 2010. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em 22/01/2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Germany investigates outbreak of haemolytic uraemic syndrome. 2011 Disponível em: <http://www.euro.who.int>. Acesso em 08/06/2011.

YAMANAKA, E. H. U.; BEUX, M. R.; MONTEIRO, C. L. B.; OLIVEIRA, C. F.; MURAKAMI, A. M. U.; MACUCO, A. L. B. Pesquisa de indicadores bacterianos em águas de consumo de fontes alternativas. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOPROCESSOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS, 4, 2010, Curitiba. **Resumos do ICBF 2010 / X ERSCTA**, Curitiba: 2010a. 1 CD-ROM.

YAMANAKA, E. H. U.; BEUX, M. R.; MONTEIRO, C. L. B.; OLIVEIRA, C. F.; MURAKAMI, A. M. U.; MACUCO, A. L. B. Risco potencial de consumo de água de fontes alternativas por patógenos entéricos e oportunistas. In: JORNADA CIENTÍFICA DE CLÍNICA MÉDICA, 3, 2010, Curitiba. **Poster**, Curitiba: 2010b.

YAMANAKA, E. H. U.; BEUX, M. R.; MONTEIRO, C. L. B.; OLIVEIRA, C. F.; MURAKAMI, A. M. U.; WAKAMORI, M.; DAUR, A. V.; BARBIERI, F. N. Pesquisa de Indicadores Bacterianos na Água através de Substratos Cromogênicos. In: Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2, 2010, Florianópolis. **Mini-comunicação**. Florianópolis: 2010c. Resumo ID: 101-1. Disponível em <https://sec.adtevento.com.br/sbm>. Acesso em: 14/10/2010.

YAMANAKA, E. H. U.; SILVA, C.A.; BAGGIO, L. M.; QUEIRÓZ, M. A.; JACOMEL, J. M.; MONTEIRO, C. S. Drinking water monitoring from fountains in public parks in Curitiba/PR. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BIOPROCESSOS NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS, 4, 2010, Curitiba. **Resumos do ICBF 2010 / X ERSCTA**, Curitiba: 2010d. 1 CD-ROM.

YAMANAKA, E. H. U.; VIANNA, C. H. M. Pesquisa Qualitativa e Quantitativa de Coliformes em Águas de Consumo Humano em dois Bairros da Fazenda Rio Grande, Região Metropolitana de Curitiba – Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, XXII, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: editora, 2003. p. 165-165.

APÊNDICE

Percentual de Enterobactérias ONPG reagentes Vs. fermentadoras de lactose

Continua

	Teste ONPG	Fermentação da Lactose
<i>B. aquatica</i>	93	87
<i>B. agrestis</i>	100	100
<i>B. brennerae</i>	100	67
<i>B. ferrugutiae</i>	100	0
<i>B. gaviniae</i>	100	60
<i>B. izardi</i>	100	100
<i>B. noackiae</i>	100	0
<i>B. warmboldiae</i>	100	0
<i>C. davisae</i>	90	19
<i>C. lapagei</i>	99	60
<i>C. neteri</i>	100	35
<i>Cedecea species</i>	100	0
<i>C. freundii</i>	89	78
<i>C. diversus (koseri)</i>	99	50
<i>C. amalonaticus</i>	97	35
<i>C. farmeri</i>	100	15
<i>C. youngae</i>	90	25
<i>C. braakii</i>	80	80
<i>C. werkmanii</i>	100	17
<i>C. sedlakii</i>	100	100
<i>C. rodentium</i>	100	100
<i>Citrobacter species 10</i>	67	67
<i>Citrobacter species 11</i>	100	67
<i>E. aerogenes</i>	100	95
<i>E. cloacae</i>	99	93
<i>E. agglomerans group</i>	90	40
<i>E. gergoviae</i>	97	55
<i>E. sakazakii</i>	100	99
<i>E. taylorae (cancerogenus)</i>	100	10
<i>E. amnigenus biogroup 1</i>	91	70
<i>E. amnigenus biogroup 2</i>	100	35
<i>E. asburiae</i>	100	75
<i>E. hormaechei</i>	95	9
<i>E. intermedium</i>	95	100
<i>E. cancerogenus</i>	100	0

<i>E. dissolvens</i>	100	0
continuação		
	Teste ONPG	Fermentação da Lactose
<i>E. nimipressuralis</i>	100	0
<i>E. pyrinus</i>	100	14
<i>E. coli</i>	95	95
<i>E. fergusonii</i>	83	0
<i>E. hermannii</i>	98	45
<i>E. vulneris</i>	100	15
<i>S. sonnei</i>	90	2
<i>E. americana</i>	85	70
<i>H. alvei</i>	90	5
<i>K. pneumoniae</i>	99	98
<i>K. oxytoca</i>	100	100
<i>K. ornithinolytica</i>	100	100
<i>K. planticola</i>	100	100
<i>K. ozaenae</i>	80	30
<i>K. terrigena</i>	100	100
<i>K. ascorbata</i>	100	98
<i>K. cryocrescens</i>	100	95
<i>K. georgiana</i>	100	83
<i>K. cochleae</i>	100	33
<i>L. adecarboxylata</i>	100	93
<i>M. visconssensis</i>	90	100
<i>P. dispersa</i>	91	0
<i>R. aquatilis</i>	100	100
Group IIIa strains	100	15
Group IIIb strains	92	85
Group V strains	94	0
<i>S. marcenscens</i>	95	2
<i>S. marcenscens</i> biogroup 1	75	4
<i>S. liquefaciens</i> group	93	10
<i>S. rubidaea</i>	100	100
<i>S. odorifera</i> biogroup 1	100	70
<i>S. odorifera</i> biogroup 2	100	97
<i>S. plymuthica</i>	70	80
<i>S. ficaria</i>	100	15
<i>S. entomophila</i>	100	0
" <i>Serratia</i> " <i>fonticola</i>	100	97
<i>T. guamensis</i>	100	0
<i>Y. enterocolitica</i>	95	5
<i>Y. frederiksenii</i>	100	40
<i>Y. intermedia</i>	90	35
<i>Y. kristensenii</i>	70	8

<i>Y. rohdei</i>	50	0
conclusão		
	Teste ONPG	Fermentação da Lactose
<i>Y. bercovieri</i>	80	20
<i>Y. pestis</i>	50	0
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	70	0
<i>"Yersinia" ruckeri</i>	50	0
<i>Y. regensburgei</i>	100	0
Enteric group 58	100	30
Enteric group 59	100	80
Enteric group 60	100	0
Enteric group 63	100	0
Enteric group 64	100	100
Enteric group 69	100	100

Fonte: MURRAY *et al.*, 2007, p 652-655